

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 13 日 (13.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/021262 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/50, 33/15, A61K 45/00, 38/16, 39/395, A61P 1/00, 1/16, 3/04, 3/10, 9/00, 25/00, 25/22, 29/00, 35/00, 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08622
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-258479 2001 年 8 月 28 日 (28.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7 番地 9-1 4 0 2 号 Ibaraki (JP). 藤井 亮 (FUJII, Ryo) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 2 丁目 3 3 番地 1 6 Ibaraki (JP). 羽畑 祐吾 (HABATA, Yugo) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木 3 丁目 1 7 番地 1-6 0 6 号 Ibaraki (JP). 川俣 裕二 (KAWAMATA, Yuji) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代 4 丁目 2 2 番地 2-2 0 3 号 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) Abstract: Using a G protein-coupled receptor protein (TGR4), which has an amino acid sequence identical or substantially identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, or its salt and a phospholipid compound, a compound or its salt capable of altering the binding properties of the receptor protein or its salt to the phospholipid compound can be efficiently screened.

(57) 要約:

配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 (TGR4) またはその塩およびリン脂質化合物を用いることにより、該レセプター蛋白質またはその塩とリン脂質化合物との結合性を変化させる化合物またはその塩を効率良くスクリーニングすることができる。



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

スクリーニング方法

5 技術分野

本発明は、ヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（TGR4）またはその塩とリガンドであるリン脂質化合物等とを用いるスクリーニング方法、新規なラットおよびマウス由来のTGR4およびそれをコードするDNA等に関する。

10

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質（7TMR）と総称される。

15

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

20

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわ

れている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

WO 00/22131号公報およびWO 00/23588号公報には、本発明で用いられるG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (TGR4) およびそのDNAが記載されているが、該レセプター蛋白質に対する具体的なリガンドや該レセプター蛋白質の機能については記載されていない。

WO 01/77326号公報には、本発明で用いられるG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (TGR4) およびそのDNAが記載されており、リガンドとしてリゾフォスファチジン酸が、関連する疾患として中枢疾患 (例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患 (例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患 (例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌 (例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病、免疫系疾患 (例えば、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、

糖尿病、アルツハイマー病等）、消化器系疾患（例えば、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等）が例示されている。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（すなわち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子

治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

- 5 本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の用途を提供するものである。すなわち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質（TGR4）もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体などの用途、さらには該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

発明の開示

- 25 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、WO 01/77326号公報に記載されているヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（TGR4）のリガンドの1つがリン脂質化合物であることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

〔1〕（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的

に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（２）リン脂質化合物を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とリン脂質化合物との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 〔２〕 G蛋白質共役型レセプター蛋白質が配列番号：１、配列番号：８または配列番号：１０で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

- 10 〔３〕 リン脂質化合物が（１）１個以上のイソプレン単位からなる繰り返し構造の末端にピロリン酸基が結合した化合物、または（２）グリセロール骨格に１個のリン酸基が結合し、さらに１個の脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合した化合物である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

〔４〕 リン脂質化合物がゲラニルゲラニル２リン酸（GGPP）、ファルネシル２リン酸（FPP）またはリゾフォスファチジン酸（LPA）

- 15 〔５〕 リン脂質化合物がゲラニルゲラニル２リン酸（GGPP）またはファルネシル２リン酸（FPP）である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

- 20 〔６〕 （１）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（２）リン脂質化合物を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とリン脂質化合物との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 25 〔７〕 上記〔１〕記載のスクリーニング方法または上記〔６〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リン脂質化合物と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

〔８〕 リン脂質化合物と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

〔９〕 中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患または

消化器系疾患の予防・治療剤である上記〔８〕記載の医薬、

〔１０〕肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤である上記〔８〕記載の医薬、

- 〔１１〕試験化合物を配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＧタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性または細胞内 cAMP 生成活性を測定することを特徴とする該Ｇタンパク質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

〔１２〕上記〔１１〕記載の方法で得られるリガンド、

- 〔１３〕（ｉ）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩とを接触させた場合と、（ii）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

- 〔１４〕（ｉ）①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を該

G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

[15] (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

[16] (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を該G蛋白質共役型レセプター

- 蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- 5
- [17] (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、 (ii) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を当該質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- 10
- 15
- 20
- 25
- [18] (i) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、 (ii) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその

塩、および試験化合物を該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性または細胞内cAMP生成活性を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

〔19〕 (i) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、 (ii) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性または細胞内cAMP生成活性を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

〔20〕リン脂質化合物が(1) 1個以上のイソプレレン単位からなる繰り返し構造の末端にピロリン酸基が結合した化合物、または(2) グリセロール骨格に1個のリン酸基が結合し、さらに1個の脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合した化合物である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔21〕リン脂質化合物がゲラニルゲラニル2リン酸(GGPP)、ファルネシル2リン酸(FPP)またはリゾフォスファチジン酸(LPA)である上記〔13〕～〔20〕記載のスクリーニング方法、

〔22〕リン脂質化合物がゲラニルゲラニル2リン酸(GGPP)またはファルネシル2リン酸(FPP)である上記〔13〕～〔20〕記載のスクリーニ

ング方法、

- 〔23〕試験化合物が配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、
- 5 リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物である上記〔13〕～〔20〕記載のスクリーニング方法、

- 〔24〕上記〔13〕～〔23〕のいずれかに記載のスクリーニング方法を用いて得られる配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩
- 10 に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、

〔25〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる医薬、

- 〔26〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
- 15 のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤、

- 〔27〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対
- 20 するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

- 〔28〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖
- 25 尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

〔29〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、

糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

- 〔30〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断剤、

- 〔31〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断方法、

- 〔32〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

- 〔33〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

- 〔34〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断剤、

〔35〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチ

ドまたはその塩に対する抗体を用いる当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法を用いることを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断方法、

- 5 〔36〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤、

- 10 〔37〕哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体または⑤配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療方法、

25 〔38〕中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤を製造

- するための①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体または⑤配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの使用、
- 15 [39] 配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、
[40] 上記[39]記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
[41] 配列番号：9または配列番号：11で表わされる塩基配列からなるD
- 20 NA、
[42] 上記[40]記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
[43] 上記[42]記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
[44] 上記[43]記載の形質転換体を培養し、上記[39]記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を生成せしめることを特徴とする上記
- 25 [39]記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
[45] 上記[39]記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
[46] 上記[40]記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
[47] 上記[40]記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

〔４８〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

〔４９〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記〔４８〕記載の抗体、

５ 〔５０〕上記〔４８〕記載の抗体を含有してなる診断剤、

〔５１〕上記〔４８〕記載の抗体を含有してなる医薬、

〔５２〕上記〔４０〕記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、

１０ 〔５３〕上記〔５２〕記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

〔５４〕上記〔５２〕記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

１５ 〔５５〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

２０ 〔５６〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット、

〔５７〕上記〔５５〕記載のスクリーニング方法または上記〔５６〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、

２５ 〔５８〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる医薬、

〔５９〕上記〔４０〕記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔６０〕上記〔４０〕記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上

記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 〔６１〕上記〔５９〕記載のスクリーニング方法または上記〔６０〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、および

〔６２〕上記〔３９〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬を提供する。

さらに、本発明は、

- 〔６３〕レセプター蛋白質が、a) 配列番号：１で表わされるアミノ酸配列、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

- 〔６４〕上記〔１〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記〔６〕記載のスクリーニング用キット、

〔６５〕上記〔１〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記〔６〕記載のスクリーニング用キット、および

- 〔６６〕上記〔１〕記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記〔６〕記載のスクリーニング用キット等を提供する。

図面の簡単な説明

図1はTGR4の疎水性プロット図である。

図2は一文字表記による配列番号：1のアミノ酸配列を示す。

5 図3はTGR4の各組織における発現分布を示す。

図4はTGR4発現ベクターを導入したCHO-mock細胞における、リン脂質化合物によるルシフェラーゼ活性の上昇を示す。横軸はリン脂質化合物の濃度を示す。GGPPはグラニルグラニル2リン酸を、FPPはファルネシル2リン酸を、LPAはリゾフォスファチジン酸を示す。baseはリン脂質化合物を添加しない場合を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性を示す。

図5はFPP（ファルネシル2リン酸）またはLPA（リゾフォスファチジン酸）添加による、CHO-mock細胞における細胞内カルシウムイオン動員活性の上昇を示す。横軸は時間（秒）を示す。縦軸はカルシウム濃度変化を示す。◇は無添加の場合を、□はFPP添加の場合を、△はLPA添加の場合を示す。

図6はFPP（ファルネシル2リン酸）またはLPA（リゾフォスファチジン酸）添加による、TGR4発現CHO細胞における細胞内カルシウムイオン動員活性の上昇を示す。横軸は時間（秒）を示す。縦軸はカルシウム濃度変化を示す。◇は無添加の場合を、□はFPP添加の場合を、△はLPA添加の場合を示す。

図7はFPP（ファルネシル2リン酸）またはLPA（リゾフォスファチジン酸）添加による、CHO-mock細胞における細胞内cAMP産生量の上昇を示す。n=3。Baseは無添加の場合を、FPPはFPP添加の場合を、LPAはLPA添加の場合を示す。縦軸はcAMP産生量を示す。

25 図8はFPP（ファルネシル2リン酸）またはLPA（リゾフォスファチジン酸）添加による、TGR4発現CHO細胞における細胞内cAMP産生量の上昇を示す。n=3。Baseは無添加の場合を、FPPはFPP添加の場合を、LPAはLPA添加の場合を示す。縦軸はcAMP産生量を示す。

図9はラットTGR4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

図10はラットTGR4のアミノ酸配列を示す。

図11はマウスTGR4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

図12はマウスTGR4のアミノ酸配列を示す。

図13はヒトTGR4 mRNAの発現分布を示す。縦軸は1 ng poly (A) + RNAあたりのヒトTGR4 mRNAのコピー数を示し、横軸は解析した組織を示す。

図14はヒトTGR4 mRNAの発現分布を示す。縦軸は1 μ lあたりのヒトTGR4 mRNAのコピー数を示し、横軸は解析した細胞および組織を示す。

図15はラットTGR4 mRNAの発現分布を示す。縦軸は1 ng poly (A) + RNAあたりのラットTGR4 mRNAのコピー数を示し、横軸は解析した組織を示す。

図16はTGR4発現CHO細胞における細胞内カルシウムイオン動員活性に対する各種リン脂質化合物の影響を調べた結果を示す。横軸のConc. (nM) は各種リン脂質化合物の濃度を示す。▲はグラニルグラニル2リン酸を、■はファルネシル2リン酸を、◆はグラニル2リン酸を、●はリゾフォスファチジン酸を、○はスフィンゴシン1リン酸を、△はノルデオキシコール酸を、□はデオキシコール酸を、◇はグラニルグラニオールを、×はファルネソールを示す。縦軸のchange of fluorescence (%) はカルシウムイオン動員活性を示す。その算出法は、ファルネシル2リン酸 2×10^{-6} MをCHO-TGR4に添加した際の反応に対するパーセント値で計算した。n = 3の平均値。

図17はmock CHO細胞における細胞内カルシウムイオン動員活性に対する各種リン脂質化合物の影響を調べた結果を示す。横軸のConc. (nM) は各種リン脂質化合物の濃度を示す。▲はグラニルグラニル2リン酸を、■はファルネシル2リン酸を、◆はグラニル2リン酸を、●はリゾフォスファチジン酸を、○はスフィンゴシン1リン酸を、△はノルデオキシコール酸を、□はデオキシコール酸を、◇はグラニルグラニオールを、×はファルネソールを示す。縦軸のchange of fluorescence (%) はカルシウムイオン動員活性を示す。

ムイオン動員活性を示す。その算出法は、ファルネシル2リン酸 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ を CHO-TGR 4 に添加した際の反応に対するパーセント値で計算した。 $n = 3$ の平均値。

図 18 は TGR 4 発現 CHO 細胞における cAMP 産生上昇活性に対する各種
5 リン脂質化合物の影響を調べた結果を示す。横軸の Conc. (nM) は各種リン脂質化合物の濃度を示す。▲はグラニルグラニル2リン酸を、■はファルネシル2リン酸を、◆はグラニル2リン酸を、●はリゾフォスファチジン酸を、○はスフィンゴシン1リン酸を、△はノルデオキシコール酸を、□はデオキシコール酸を、◇はグラニルグラニオールを、×はファルネソールを示す。縦軸
10 は cAMP 産生上昇活性を示す。cAMP 産生上昇活性はファルネシル2リン酸 $1.15 \times 10^{-6} \text{M}$ を CHO-TGR 4 に添加した際の反応に対するパーセント値で計算した。 $n = 3$ の平均値。

図 19 は mock CHO 細胞における cAMP 産生上昇活性に対する各種
リン脂質化合物の影響を調べた結果を示す。横軸の Conc. (nM) は各種
15 リン脂質化合物の濃度を示す。▲はグラニルグラニル2リン酸を、■はファルネシル2リン酸を、◆はグラニル2リン酸を、●はリゾフォスファチジン酸を、○はスフィンゴシン1リン酸を、△はノルデオキシコール酸を、□はデオキシコール酸を、◇はグラニルグラニオールを、×はファルネソールを示す。縦軸は cAMP 産生上昇活性を示す。cAMP 産生上昇活性はファル
20 ネシル2リン酸 $1.15 \times 10^{-6} \text{M}$ を CHO-TGR 4 に添加した際の反応に対するパーセント値で計算した。 $n = 3$ の平均値。

発明を実施するための最良の形態

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記
25 する場合がある）は、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列（図 2）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサン

ギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞

5 細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳

10 髄、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

15

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

20

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

25

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の

方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

- また、本発明のレセプター蛋白質としては、a) 配列番号：1、配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：1、配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：1、配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。
- 本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの $\text{C}_1 - 6$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_5 - 8$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの $\text{C}_6 - 12$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_1 - 2$ アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- $\text{C}_1 - 2$ アルキル基などの $\text{C}_7 - 14$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化さ

れているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂-。アルカノイル基などのC₁-。アシル基など）で保護されているもの、
5 N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂-。アルカノイル基などのC₁-。アシル基
10 など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質（ヒトTGR4）、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列（図10）からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質（ラットTGR4）、配列番号：10で表わされるアミノ酸配列（図12）からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質（マウスヒトTGR4）
15 などが用いられる。このうち、ラットTGR4およびマウスTGR4は新規な蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。
20

具体的には、配列番号：1、配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。
25

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

- 5 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

- 10 また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上
15 （好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、上記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であ
20 ってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、
25 N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または

塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、5 蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後10 に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー15 を組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジル20 アルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知25 の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性

化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、

シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリープチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエ

- チルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- 15 蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

- 25 蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することに

よって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の a) ～e) に記載された方法が挙げられる。

- a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)
 - b) Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)
 - c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)
 - d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、(1977 年)
 - e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第 14 巻 ペプチド合成 広川書店
- また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。
- 本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列 (DNA または RNA、好ましくは DNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA、mRNA 等の RNA であり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖 DNA、二本鎖 RNA または DNA : RNA のハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新 PCR とその応用」15(7)、1997 記載の方法またはそれ

に準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅

5

10

することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

15

配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

20

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

25

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約

6 5℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列からなるDNAなどが、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列からなるレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列からなるDNAなどが、配列番号：10で表わされるアミノ酸配列からなるレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：11で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸

を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金

属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α アノマー型の核酸など)であってよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホス

- ホリピド、コレステロールなど)といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

- アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。
- 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

- 具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
- (1) 配列番号: 2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号: 2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列

を有するDNAなどが用いられる。

配列番号.: 2 で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号.: 2 で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性
5 性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに
10 組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行
15 なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutant^T M-super Express Km (宝酒造 (株))、Mutant^T M-K (宝酒造 (株)) などを用いて、ODAL-PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。
20

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATG
25 Gを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)

該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

10 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

15 これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、20 PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること25 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が

挙げられる。特に、CHO (d h f r⁻) 細胞を用いて d h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (Saccharomyces

cerevisiae) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7-1 1 A, DKD-5 D、2 0 B-1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) N CYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (Pichia pastoris) などが用いられる。

- 5 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell ; S f 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来の MG 1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five^{T M} 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N ; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。
- 10

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

- 15 動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, V e r o, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記)、d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (d h f r⁻) 細胞と略記)、マウス L 細胞, マウス A t T-2 0、マウスミエローマ細胞、ラット GH 3、ヒト F L 細胞などが用いられる。

- 20 エシエリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 6 9 巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) やジーン (Gene) , 1 7 巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) , 1 6 8 巻, 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 1 9 4 巻, 1 8 2-1 8 7 (1 9 9 1) 、プロシーディングズ・

オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユー
エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978) など
に記載の方法に従って行なうことができる。

5 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー
(Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことが
できる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロ
トコル、263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology),
52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

10 このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含
有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培
養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体
の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源と
15 しては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素
源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、
ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または
有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウ
ム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生
20 長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ
ミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメ
ンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in
Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New
25 York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせ
るために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えること
ができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時
間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や 0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下

記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 10 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。
- 15

- 20 かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 25 なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイな

どにより測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

10 〔モノクローナル抗体の作製〕

 (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と

- 同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

- 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

- また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 5 本発明のレセプター蛋白質またはその塩のリガンドはリン脂質化合物であり、例えば、(1) 1個以上のイソプレン単位からなる繰り返し構造の末端にピロリン酸基が結合した化合物、または(2) グリセロール骨格に1個のリン酸基が結合し、さらに1個の脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合した化合物などが用いられる。

- 10 イソプレン単位の繰り返しは、1個以上、好ましくは1～6個、さらに好ましくは2～4個である。

脂肪酸としては、例えば、炭素数6～30個程度の脂肪酸が好ましく、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などが用いられる。

- 15 長鎖アルコールとしては、例えば、炭素数6～30個程度のアルコールが好ましく、具体的には、テトラデカノール、ペンタデカノール、ヘキサデカノール、オクタデカノールなどが用いられる。

グリセロール骨格への1個のリン酸基の結合の位置は、特に限定されないが、例えば、3位の水酸基に結合するのが好ましい。

- 20 グリセロール骨格への脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合する位置は、特に限定されないが、例えば、1位もしくは2位の水酸基にエステル結合するのが好ましい。

より具体的には、リン脂質化合物としては、ゲラニルゲラニル2リン酸(GGP)、ファルネシル2リン酸(FPP)またはリゾフォスファチジン酸(L

- 25 PA)などが用いられ、なかでもゲラニルゲラニル2リン酸(GGP)またはファルネシル2リン酸(FPP)が好ましく用いられる。

したがって、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある)、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記す

る場合がある）、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、以下の用途を有している。

5 (1) 本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

 a) 本発明のレセプター蛋白質または b) 該レセプター蛋白質をコードする DNA を、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

 例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているために、
10 リガンドであるリン脂質化合物の生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、a) 本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、b) (イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA を該患者に投与し発現させることによって、あるいは (ロ) 対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA を挿入し発現
15 させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA は、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

20 具体的には、本発明のレセプター蛋白質または本発明の DNA は、例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、
25 免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、消化器系疾患（例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等）、不安、痛み、肥満などの疾

患の予防および／または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明の
5 DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ア
デノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入
した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのま
まで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカ
テーテルのようなカテーテルによって投与できる。

10 例えば、a) 本発明のレセプター蛋白質またはb) 本発明のDNAは、必要に
応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤な
どとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との
無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例え
ば、a) 本発明のレセプター蛋白質またはb) 本発明のDNAを生理学的に認め
15 られる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤など
とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和すること
によって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された
範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼ
20 ラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性
セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのよ
うな膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または
サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような
香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ
25 イプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のた
めの無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油な
どのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施
に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩
水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D

ーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート 80TM、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例
5 えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防
10 止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、
15 サルなど)に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に
20 投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換
25 算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場

合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(2) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics) , 第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のレセプター蛋白質の発現低下が検出された場合は、例えば、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のレセプター蛋白質の発現過多が検出された場合は、例えば、本発明のレセプター蛋白質の過剰発現に起因する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患または本発明のペレセプター蛋白質の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、
5 消化器系疾患（例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等）、不安、痛み、肥満などが挙げられる。

（３）本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する医薬

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター
15 蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、（i）非ヒト哺乳動物のa）血液、b）特定の臓器、c）臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ii）形質転換体等に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定
20 することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

（i）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、
25 ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、

または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

- 得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、
- 5 自体公知の手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

- 10 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後
- 15 （30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより
- 20 行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。
- 25

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを

介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、

5 (ロ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10 本発明のレセプター蛋白質のリガンドは、上記のとおり、リン脂質化合物である。したがって、上記スクリーニング方法で得られる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

15 具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

20 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の発現過多に起因する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患または本発明のレセプター蛋白質の発現過多に起因する疾患としては、例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等）、

25

肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、
消化器系疾患（例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、
下痢、イレウス等）、不安、痛み、肥満などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組
5 成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキ
シル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以
外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形
で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担
10 体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に
認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造す
ることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容
量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼ
15 ラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性
セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのよ
うな膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または
サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような
香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ
20 イプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のた
めの無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油な
どのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施
に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩
水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D
25 -マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、
例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレング
リコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソル
ベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例
えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、

ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防

5 止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、

10 サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

15 20

（4）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法および診断方法

本発明の抗体は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドであるリン脂質化合物を特異的に認識することができるので、被検液中のリン脂質化合物の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

25

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のレセプター蛋白質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のレセプタ

一蛋白質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質の定量法、および

- (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識
- 5 剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

- 10 また、本発明のレセプター蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて本発明のレセプター蛋白質の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

- 15 本発明の抗体を用いる本発明のレセプター蛋白質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のレセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。
- 20 例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられ
- 25 る。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用い

られる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

5 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常本発明のレセプター蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

10 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記の
15 それらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

20 本発明のサンドイッチ法による本発明のレセプター蛋白質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のレセプター蛋白質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のレセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を
25 認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応さ

せたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものをを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part

E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

- 5 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のレセプター蛋白質の濃度を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の濃度の減少が検出された場合、例えば、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患である、
10 または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質の濃度の増加が検出された場合には、例えば、本発明のレセプター蛋白質の過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患または本発明のレセ
15 プター蛋白質の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、中枢性疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病、免疫系疾
20 患(例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等)、肝臓・胆のう疾患(例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等)、消化器系疾患(例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等)、不安、痛み、肥満など
25 が挙げられる。

(5) 本発明のレセプター蛋白質に対するリン脂質化合物以外のリガンドの決定方法

リン脂質化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することによって、細胞内 Ca^{2+} の遊離、細胞内 cAMP 生成が見られることから、本発明のレセプター

一蛋白質はこの細胞内シグナルを指標として本発明のレセプター蛋白質に対するリン脂質化合物以外のリガンドを探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のレセプター蛋白質を介した細胞内 Ca^{2+} 遊離活性（細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性）または細胞内 cAMP 生成活性を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチド Y、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレイテッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1 などの CXC ケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , HCC-1, MIP-3 α /LARC, MIP-3 β /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLC などの CC ケモカインサブファミリー；lymphotactin などの C ケモカインサブファミリー；fractalkine などの CX3C ケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィ

ンゴシン1ーリン酸など)の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプタータンパク質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、組換え型GRP40の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質を介する細胞内 Ca^{2+} 遊離活性(細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性)または細胞内cAMP生成活性を有する化合物またはその塩を決定する方法である。

より具体的には、本発明は、次のような決定方法を提供する。

(1) 試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における細胞内 Ca^{2+} 遊離活性(細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性)または細胞内cAMP生成活性を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

(2) 試験化合物を本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における本発明のレセプター蛋白質を介する細胞内 Ca^{2+} 遊離活性(細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性)または細胞内cAMP生成活性を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記の試験を行なうことが好ましい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法

- 、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば
- 5 、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現した本発明のレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。
- 10 本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞やその細胞膜面分中の本発明のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようにな
- 15 る。
- 本発明のリガンドを決定方法を実施するためには、本発明のレセプター蛋白質を介する細胞内 Ca^{2+} 遊離活性（細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性）または細胞内cAMP生成活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を
- 20 マルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、 Ca^{2+} 、cAMPなど）の生成が、細胞が
- 25 含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質を含有する細

胞またはその細胞膜面分を含有するものである。

このようにして決定される本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドは、本発明のレセプター蛋白質に結合してその生理的機能を調節するので、本発明のレセプター蛋白質の機能に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、および本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬

- 10 本発明のレセプター蛋白質を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドであるリン脂質化合物等と本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- 15 このような化合物には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など、特に細胞内 Ca^{2+} 遊離活性（細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性）、細胞内cAMP生成活性）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、
- 20 (ハ) リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記(イ)の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、(i) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプ

ター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5 本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該レセプター蛋白質に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- 10 a) 標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 15 b) 標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 20 c) 標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、
25 比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

d) 本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物および

試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- 5 e) 本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 10

- リガンドとしては、上記したガラニルガラニル2リン酸（GGPP）、ファルネシル2リン酸（FPP）またはリゾフォスファチジン酸（LPA）などのリン脂質化合物が用いられる。
- 15

- さらに、リガンドとしては、リン脂質化合物と本発明のレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩を用いることもできる。このリン脂質化合物と本発明のレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとしてリン脂質化合物を用いて、後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。
- 20

- 本発明のレセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にス
- 25

クリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質などが適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプタ

一蛋白質であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

- 本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

- 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 該レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

- リガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の a) ~ c) を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。こ

ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含む細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（望ましくは pH 6~8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~10 ml の該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm~500000 cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4}M ~ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0~50℃、望ましくは約 4~37℃で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を 100% とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物スクリ

ーニングする上記の d) ～e) の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など、特に細胞内 Ca^{2+} 遊離活性（細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性）、細胞内 cAMP 生成活性）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質を有する細胞株、上記の組換え型レセプター蛋白質を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

また、試験化合物としては、本発明のレセプター蛋白質の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。本発明のレセプター蛋白質の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知

の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

b) G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5 $\times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

c) 標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などと標識したリガンド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

d) リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

b) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識リガン

ドを $5 \mu\text{l}$ 加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} M のリガンドを $5 \mu\text{l}$ 加えておく。

- 5 c) 反応液を除去し、 1 ml の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを $0.2 \text{ N NaOH} - 1\% \text{ SDS}$ で溶解し、 4 ml の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

d) 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

- 10 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質との結合性を
15 変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G 蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物 (いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物 (いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、
20 あるいは (ニ) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 25 また、化合物は、前記した本発明のレセプター蛋白質の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて設計された化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドであるリン脂質化合物が有する生理活性と同様の作用を有

しているので、リン脂質化合物が有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドであるリン脂質化合物が有する生理活性を抑制することができるので、リン脂質化合物の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を増強することができるので、リン脂質化合物が有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を減少させることができるので、リン脂質化合物の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、中枢性疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病、免疫系疾患(例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等)、肝臓・胆のう疾患(例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等)、消化器系疾患(例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等)、不安、痛み、肥満などの疾患に対する予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担

5 体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記

10 タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-

15 -マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、

20 ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防

止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（7）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する医薬

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

（i）非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の

レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表面での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表面での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX100TM、ツイーン20TMなど）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやボ

リトロン (Kinematica 社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500

5 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、
- 10 例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウェスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様に行なうことができ、ウェスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

- (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質
- 15 転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理
- 20 的ストレスなどを与える一定時間前 (30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前) もしくは一定時間後 (30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後 (30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日
- 25 後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後 (1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましく

は2日後～3日後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

- 5 (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定
- 10 時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本
- 15 発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、
- 20 c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。
- 25

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発

酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の発現過多に起因する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物またはその塩は、例えば、中枢性疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病、免疫系疾患(例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等)、肝臓・胆のう疾患(例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等)、消化器系疾患(例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等)、不安、痛み、肥満などの疾患に対する予防・治療剤として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に

認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、高血圧症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高血圧症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（8）本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体を含有してなる医薬

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の中和活性とは、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。

したがって、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する中和抗体は該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患（例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖

尿病、アルツハイマー病等)、肝臓・胆のう疾患(例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等)、消化器系疾患(例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等)、不安、痛み、肥満などの疾患)の予防・治療剤として用いることができる。

5 (9) 本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のレセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患(例えば、中枢性疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病、免疫系疾患(例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等)、肝臓・胆のう疾患(例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等)、消化器系疾患(例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等)、不安、痛み、肥満などの疾患)の予防・治療剤として用いることができる。

例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

25 さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(1.0) 本発明のDNA導入動物の作製

本発明は、外来性の本発明のDNA(以下、本発明の外来性DNAと略記

する) またはその変異DNA (本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある) を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
5 [2] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]記載の動物、
[3] ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第[2]記載の動物、および
[4] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

- 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物 (以下、本発明のDNA転移動物と略記する) は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階 (さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前) に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。
- 10
15
20

- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス (例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など) またはラット (例えば、Wistar, SDなど) などが好ましい。
- 25

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

5 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10 該異常DNAとしては、異常な本発明のレセプター蛋白質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のレセプター蛋白質の機能を抑制するレセプター蛋白質を発現させるDNAなどが用いられる。

15 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、
20 本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロイン
25 ジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワク
25 シニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイル

ス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど)に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキニンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、
5 エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ペプチド鎖延長因子1 α
10 (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。
15

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。
20

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一

部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

5 正常な本発明のレセプター蛋白質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なレセプター蛋白質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することが
10 できる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性
20 DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

25 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け

継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するよう
5 うに繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のレセプター蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転
10 移動物を用いて、本発明のレセプター蛋白質の機能亢進症や、本発明のレセプター蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のレセプター蛋白質の増加症状を有することから、本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。
15 る。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを
20 前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在すること
25 は、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するよう

に繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高
発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終
的に本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、そ
5 の病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DN
A転移動物を用いて、本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症の病
態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、
本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常レセ
10 プター蛋白質による正常レセプター蛋白質の機能阻害（dominant negative作
用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明
のレセプター蛋白質の増加症状を有することから、本発明のレセプター蛋白
質またはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用
15 可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、
例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する
20 か、またはDNAにより発現されたレセプター蛋白質組織を分析することによ
る、本発明のレセプター蛋白質により特異的に発現あるいは活性化するレ
セプター蛋白質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使
用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 25 ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のス
クリーニング、および
- ⑤本発明の変異レセプター蛋白質を単離精製およびその抗体作製などが考え
られる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のレセプター蛋白質の

機能不活性型不応症などを含む、本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献
5 することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のレセプター蛋白質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖
10 との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のレセプター蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のレセプター蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明のレセプター蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効
15 で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のレセプター蛋白質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

20 (11) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 25 [2] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第[1]項記載の胚幹細胞、
- [3] ネオマイシン耐性である第[1]項記載の胚幹細胞、
- [4] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]項記載の胚幹細胞、
- [5] ゲッ歯動物がマウスである第[4]項記載の胚幹細胞、

〔6〕本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
〔7〕該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、

- 5 〔8〕非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
〔9〕ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および
〔10〕第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 15 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のレセプター蛋白質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のレセプター蛋白質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 20 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

- 25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -

ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列 (例えば、polyA付加シグナルなど) を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖 (以下、ターゲッティングベクターと略記する) を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス (C57BL/6とDBA/2とのF₁) を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mMEDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mMEDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋

- などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; 5 T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のレセプター蛋白質または本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。
- 10 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。
- 該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。
- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作
- 15 製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。
- 20 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳
- 25 動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞

との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のレセプター蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のレセプター蛋白質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のレセプター蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、

これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(11a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

10 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

20 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

25 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物か

ら選ばれた化合物であり、本発明のレセプター蛋白質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、リュウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、

5 消化器系疾患（例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等）、不安、痛み、肥満）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

15 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例

20 えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

25

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなど

により差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に高血
圧症患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1
～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～
20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投
5 与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形
で通常、高血圧症患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき
該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、
より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都
合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与すること
10 ができる。

(11b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害す
る化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与
し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに
15 対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスク
リーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動
物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本
発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レ
20 ポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しう
るものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクト
シダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子また
25 はルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全
非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモ
ーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現を
トレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のレセプター蛋白質の発現する組織で、本発明のレセプター蛋白質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) 5
のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のレセプター蛋白質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のレセプター蛋白質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または37℃付近で、
10 約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによつて、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

15 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、
20 有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との
25 塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質の発現を促進し、該レセプター蛋白質の機能を促進することができるので、例えば、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質の発現を阻害し、該レセプター蛋白質の機能を阻害することができるので、例えば、本発明のレセプター蛋白質の発現過多に関連する疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

- 5 具体的には、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー性疾患、喘息、リュウマチなど）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、
- 10 子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、糖尿病、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、AIDS、アトピー性皮膚炎、アレルギー性疾患、免疫不全、喘息、
- 15 リウマチ性関節炎、乾癬、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、消化器系疾患（例えば、潰瘍、腸炎、消化不良、過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、下痢、イレウス等）、不安、痛み、肥満などの疾患に対する予防・治療剤として使用することができる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 20 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のレセプター蛋白質またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に高血圧症患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経

口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常、高血圧症患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのレセプター蛋白質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のレセプター蛋白質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン

	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
5	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
10	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
15	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
20	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
25	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン

	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する
5	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
10	また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。	
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
15	C l ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
20	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
25	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

F a m : 6-カルボキシーフルオレセイン

T a m r a : 6-カルボキシーテトラメチルーローダミン

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：1

- 5 本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

- 10 配列番号：3

以下の参考例1におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

配列番号：4

- 15 以下の参考例1におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

配列番号：5

以下の参考例2におけるPCR反応で使用したプローブの塩基配列を示す。

配列番号：6

以下の参考例2におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

- 20 配列番号：7

以下の参考例2におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：8

本発明のラット由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4のアミノ酸配列を示す。

- 25 配列番号：9

本発明のラット由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号：10

本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4のアミノ

酸配列を示す。

配列番号：11

本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

5 配列番号：12

以下の実施例4におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：13

以下の実施例4におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：14

10 以下の実施例5におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：15

以下の実施例5におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：16

以下の実施例8におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

15 配列番号：17

以下の実施例8におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：18

以下の実施例8におけるPCR反応で使用したプローブの塩基配列を示す。

以下の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli)

20 DH5 α /pCR-B1unt-TGR4は、平成12(2000)年4月3日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH))に寄託番号FERM BP-7115として、平成12(2000)年3月23日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85の財団
25 法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16409として寄託されている。

以下の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pTArTGR4は、平成14(2002)年8月8日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許

生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8147として寄託されている。

以下の実施例5で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pTAmTGR4は、平成14(2002)年8月8日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許
5 生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8146として寄託されている。

実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、
10 モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

参考例1 G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳cDNA (GIBCO BRL 社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー
1 (5'-GGG TCG ACA TGT TAG CCA ACA GCT CCT CAA CCA AC-3' ; 配列番号: 3)
15 およびプライマー2 (5'-GGA CTA GTT CAG AGG GCG GAA TCC TGG GGA CAC-3' ; 配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの50分の1量を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase
(STRATAGENE 社) 50分の1量、プライマー1およびプライマー2を各0.8
 μ M、dNTPsを400 μ M、および酵素に添付のバッファーを加え、総5
20 0 μ lとした。PCR反応は、94℃・2分の後、94℃・15秒、56℃・15秒、72℃・100秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen 社) の処方に従い、プラスミドベクターpCR-Blunt Vector
(Invitrogen 社) へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、
25 目的のcDNAを持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする1116塩基対のcDNA配列(配列番号: 2)を得た。
このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号: 1)を有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR4と命名し、配列番号: 2で表される

DNAを含有する形質転換体が大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR-Blunt-TGR4と命名した。

TGR4の疎水性プロット図を図1に示す。

参考例2 TGR4の発現組織分布の解析

5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR4の発現組織分布の解析は、リアルタイムモニタリングによる定量的PCR法(TaqMan法)によって行った。TaqMan法はPCR増幅された特異的PCR鎖をTaqManプローブと呼ばれる蛍光プローブの蛍光強度によってリアルタイムにSDS7700によって検出、定量する原理に基いている。

10 TGR4を特異的に認識するTaqManプローブおよびプライマーは、Primer Express (PE Applied Biosystems社製ソフトウェア)を用いて設計し合成した。

TaqMan PCR反応における反応組成は、Human MTC Panel I&II (CLONTECH社)の16種類のcDNAを鋳型として使用し、
15 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems社) 12.5 μ l、200nM TaqManプローブ(配列番号5)、TaqManプライマー(配列番号:6および配列番号:7)各々100nMになるように加え、総25 μ lの液量とした。PCR反応は50 $^{\circ}$ C・2分、95 $^{\circ}$ C・10分の後、95 $^{\circ}$ C・15秒、62 $^{\circ}$ C・
20 1分のサイクルを40回行い、反応終了と同時にPCRの定量的自動解析を行った。また標準化は、TaqMan GAPDH Control Reagents (PE Applied Biosystems社)を用いて同様の系で行った。結果を図3に示す。

実施例1 TGR4を一過性に発現させたCHO細胞におけるリン脂質化合物
25 によるレポーター遺伝子発現量の測定

動物細胞用発現プラスミドベクターpAKKO-111H (Biochem. Biophys. Acta, Hinuma, S. et al. 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKKO-1.11Hと同一のプラスミドベクター)に公知の方法によってTGR4 cDNA、あるいは抑制性

G蛋白質 α サブユニットGi cDNAを挿入して作製した発現ベクタープラスミドpAK-TGR4、pAK-Gi、および特定の遺伝子を挿入していないもとのpAKKO-111Hを以下の方法によってCHO細胞へトランスフェクションした。

- 5 まずこれらのベクターを用いて、大腸菌JM109を形質転換し、得られたコロニーを単離・培養後、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (キアゲン社)を用いてプラスミドの調製を行なった。また、cAMPレスポンスエレメント(CRE)の下流にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子が連結されたpCRE-Luc (Clontech社)のプラスミドを同様にして調製した。CHO (dhfr⁻)細胞をpAKKO-111Hで形質転換したCHO-mock細胞を96-well黒色プレート(コスター社)に40,000細胞/well、培養液量100 μ lで播種し、一晚培養した。プレートで培養するための培地はDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、GibcoBRL社)10%のウシ胎児血清(FBS、GibcoBRL社)のみを添加したものを用いた。よりレポーター遺伝子発現量の上昇を明確に検出するため、pAK-GiをpAK-TGR4と同時にトランスフェクションした。各プラスミドはpAK-TGR4、pAK-GiおよびレポータープラスミドpCRE-Lucを7:3:1の割合で240 μ lのOpti-MEM-I (GibcoBRL社)に添加した。これを、
10 同じく240 μ lのOpti-MEM-Iに10 μ lのリポフェクトアミン2000 (GibcoBRL社)を添加したものと等量混合して、リポフェクトアミン2000に添付のマニュアル記載の方法に従ってリポソームとプラスミドの複合体を形成させた。これらを25 μ l/wellずつCHO-mock細胞の培養液に添加し、37℃で4時間培養した後、培養液をアッセイバッファ
15 ー(0.1%のウシ血清アルブミンを添加したDMEM)に交換し、プラスミドの導入を行った。これらの細胞は更に37℃、5%CO₂条件下で一晚培養した。
20 25 上記でトランスフェクションしたCHO-mock細胞に、アッセイ用培地にて希釈したガラニルガラニル2リン酸(GGPP, Sigma社)、ファルネシル2リン酸(FPP, Sigma社)、リゾフォスファチジン酸(LPA

, Sigma社) 1, 0. 1, 0. 01 μ Mとなるよう添加し、37℃、5% CO₂条件下で4時間培養した。培養上清を捨てて、ルシフェラーゼ活性測定用の基質であるピッカジーンLT2. 0 (東洋インキ製造株式会社) を50 μ l 添加し、プレートリーダー (ARVO s x マルチラベルカウンター、Wall
5 ac社) を用いてルシフェラーゼの発光量を測定した。

その結果、TGR4遺伝子を導入した細胞において、1, 0. 1 μ MのGGPPおよびFPP、1 μ MのLPAによるルシフェラーゼ活性の上昇が認められ (図4)、TGR4を発現したCHO細胞が上記のリン脂質化合物によって活性化されたことが示された。

10 実施例2 リン脂質化合物によるTGR4発現CHO細胞の細胞内カルシウムイオン動員活性の測定

実施例1にて作製したTGR4発現用プラスミドを用いて自体公知の方法によりTGR4の安定的な発現CHO細胞、CHO-TGR4を作製した。CHO-TGR4あるいは受容体遺伝子を導入していないCHO-mock細胞を
15 30000 cells/ウェルの濃度でBlack plate, Clear bottomの96ウェルプレート (コスター社) に播種し、37℃ 5%CO₂で1晩培養したものをアッセイに使用した。洗浄バッファーとしてHank's balanced salt solution (HBSS、Gibco BRL社) に20mM HEPES pH7. 4、2. 5mM プロベネシ
20 ド (Sigma社) を添加したものを調製した。サンプルバッファーには洗浄バッファーに0. 1%ウシ血清アルブミン (BSA、Sigma社) を添加したものをを用いた。洗浄バッファーに1%FBS、4 μ M Fluo 3-AM (和光純薬)、0. 04%Pluronic acid (Molecular Probes社) を加えたものを色素ローディング液とした。細胞の培地を捨てて色素ローディング液を添加し37℃1時間培養したのち、プレートウォッ
25 シャーを用いて洗浄バッファーで細胞を洗浄した。Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR、Molecular Devices社) に細胞をセットし、サンプル添加後約3分間の細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定した。サンプルはFPP、LPAを2. 5 μ

Mとなるよう添加した。その結果、図5および図6に示すとおり、FPP、LPAを添加した際、CHO-TGR4特異的に、細胞内カルシウムイオン動員活性が上昇することが分かった。

5 実施例3 リン脂質化合物によるTGR4発現CHO細胞内のcAMP産生量の測定

実施例2で作製したCHO-TGR4あるいは受容体遺伝子を導入していないCHO-mock細胞を25000 cells/ウェルの濃度で96ウェルプレート(ベクトンデッキンソン社)に播種し、37℃ 5%CO₂で1晩培養したものをアッセイに使用した。サンプルバッファーはHBSSに0.1%B
10 SAおよび0.2mM IBMX (Sigma社)を添加したものを用いた。細胞をサンプルバッファーで2回洗浄し、37℃で30分間プレインキュベーションした後、さらに細胞を2回洗浄し、サンプルを添加して37℃で30分間インキュベーションした。サンプルはファルネシル2リン酸、リゾフォスファチジン酸を2μMとなるよう添加した。サンプルとのインキュベーションの後
15 、細胞内のcAMP産生量はcAMP Screen System (ABI)を用いて測定した。その結果、図7および図8に示すようにFPP、LPAを添加した際、CHO-TGR4特異的に、細胞内cAMPの産生量が上昇することが分かった。

20 実施例4 ラット脳cDNAからのPCR法によるラット型TGR4受容体遺伝子の取得

ラット脳cDNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

rF: 5'-GTCGACATGCCTCAGACTAGTTTCTCTCCCCAC-3' (配列番号: 12)

rR: 5'-GCTAGCCTTTTCAGAGGGCTGAATCTTGGGGGCC-3' (配列番号: 13)

25 PCRの反応液はcDNA溶液1μmol、0.5μmol rF (10μmol)、0.5μmol rR (10μmol)、2.5μmol添付の10x反応液、2.5μmol dNTP (10mM)、0.5μmol KlenTaq (クローンテック)、17.5μmol大塚蒸留水を加えて合計25μmolにした。反応液を、Th

- ermalCycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・60秒のサイクルを40回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約1000bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuia gen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図9で示す配列がえられた。図9のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図10に示すものであった。次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社)を用いて大腸菌JM109にサブクローニングし、大腸菌JM109/pTArTGR4を取得した。
- 10 サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpTArTGR4をプラスミド抽出機 (クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列がラット型TGR4受容体cDNAであることを確認した。またラット型とヒト型は79%の相同性を示した。

- 実施例5 マウス脳cDNAからのPCR法によるマウス型TGR4受容体遺伝子の取得

マウス脳cDNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

mF: 5'-GTGCACATGCCTCAGACTAATTTCTCTTCCCAC-3' (配列番号: 14)

mR: 5'-GCTAGCTCAGAGAGCAGAATCCTGGGAGCAGTT-3' (配列番号: 15)

- 20 PCRの反応液はcDNA溶液1microl、0.5microl mF (10microm)、0.5microl mR (10microm)、2.5microl 添付の10x反応液、2.5microl dNTP (10mM)、0.5microl KlenTaq (クローンテック)、17.5microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、ThermalCycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・60秒のサイクルを40回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約1000bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuia gen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を
- 25

行ったところ図11で示す配列がえられた。図11のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図12に示すものであった。次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109 / pTAmTGR4 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTAmTGR4 を
5 プラスミド抽出機 (クラボウ社) を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列がマウス型 TGR4 受容体 cDNA であることを確認した。また、マウス型とヒト型は 81% の相同性を示した。

実施例6 CHO細胞に発現させたTGR4-GFP融合タンパク質のファル
10 ネシル2リン酸添加による細胞内移行

TGR4のC末端に翻訳のフレーム合わせてオワンクラゲより単離された Green Fluorescent Protein (GFP) cDNAをつないだ融合タンパク質を発現させるための発現プラスミドを構築した。その際GFP cDNAにはGFPの発現ベクターpQBI25 (宝酒造) から切り出した断片を用いた。TGR
15 4はPCR法によりその終止コドン制限酵素NheIの認識配列に修正し、ここにGFP断片を連結して、発現ベクターpAKKO-111Hに挿入した。このようにして得たTGR4とGFPの融合蛋白(以下、TGR4-GFP)発現ベクターのプラスミドを以下の方法でCHO-mock細胞にトランスフェクションした。CHO-mock細胞は増殖培地 [DMEM (Dulbecco
20 's Modified Eagle Medium) (GIBCO BRL社) に10%ウシ胎児血清 (GIBCO BRL社) を添加したもの]に懸濁し、 0.6×10^5 cells/チャンバーの濃度にてチャンパー数4つのLab-Tek IIカバーグラスチャンパー (Nalgen Nunc社) にまき、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養した後にトランスフェクションした。トランスフェクションにはLipofectamine™ 2000 Reagent (GIBCO
25 BRL社)を用いた。まずLipofectamine™ 2000 Reagent 2 μlとOPTI-MEM-I (GIBCO BRL社) 50 μlを混合し、20分間室温で静置することによりDNAとリポフェクトアミンの複合体を形成させた後、上記のCHO細胞を培養したチャンパーに100 μl添加し、さらに3

7℃、5%CO₂条件下で一晩培養した。培地を共焦点顕微鏡観察用培地 [Hanks' Balanced Salt Solution (GIBCO BRL社) に0.1%ウシアルブミン (Essentially Fatty Acid Free、GIBCO BRL社) を懸濁したもの] に置き換え、共焦点顕微鏡 (ライカ社) でGFPの蛍光像を観察した。その際、GFPの励起は488nmで行った。

その結果、TGR4-GFP融合蛋白は細胞膜に観察された。この細胞にファルネシル2リン酸を10⁻⁶Mとなるように培地に添加30分後には、GFPの蛍光が細胞膜ではなく、細胞質に移動していることが見出された。このことはTGR4が細胞膜に発現するGタンパク質共役型の受容体であるとともに、TGR4がファルネシル2リン酸に反応して細胞質へ移行、すなわちインタナリゼーションしたことを示していた。

実施例7 ヒトTGR4 mRNA発現分布解析

mRNAの発現量の定量にはABI PRISM 7700 Sequence Detector (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。発現量の定量に用いるプライマーとプローブは、ヒト型TGR4の塩基配列 (配列番号:) をもとにABI PRISM 7700 Sequence Detector専用のソフトウェアPrimer Express (アプライドバイオシステムズ社) を利用してデザインした。鋳型となるcDNAは、ヒト各種組織由来のpolyA+RNA (クロンテック社) 1 μgからランダムプライマーを用いて42℃で合成した。逆転写反応にはSuperScript II逆転写酵素 (GIBCO BRL社) を用い、添付のマニュアルに従って反応を行い、反応終了後エタノール沈殿して100 μlに溶解した。また分画したヒト血球由来のcDNAとしてはMultiple Tissue cDNA (MYTC™) panels Human Blood Fractions (クロンテック社) を使用した。ABI PRISM 7700 Sequence Detectorの反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) のマニュアルにしたがい、マスターミックスを12.5 μl、プライマーを0.9 μM、プローブを0.25 μM、各サンプルの

cDNA溶液を1 μ lで混ぜ合わせ、蒸留水で25 μ lとして調製した。ABI PRISM 7700 Sequence Detectorでの反応は、50℃で2分、95℃で10分の後、95℃ 15秒、60℃ 1分のサイクルを40回繰り返して行った。

- 5 ヒト各種組織でのTGR4 mRNAの発現分布を図13に示す。脾臓、リンパ節など免疫に関与する組織での高発現が見出された。またヒト血球でのTGR4 mRNAの発現量を図14に示す。

実施例8 ラットTGR4 mRNA発現分布解析

- 10 Wistarラットより各種臓器を摘出し、total RNAをIsogen (ニッポンジーン社) を用いて調製し、得られたtotal RNAからmRNA purification kit (ファルマシア社) によりpoly (A) +RNAを調製した。いずれもそれぞれのマニュアルにしたがって調製をおこなった。得られたpoly (A) +RNA 1 μ gをDnase I (Amplification Grade, GIBCO BRL社) 処理後、
- 15 160 ng分をRNA PCR Kit (Takara社) を用いて、マニュアルに従い42℃でcDNAを合成した。合成されたcDNAはpoly (A) +RNA換算で4 ng/ μ lの溶液とし、以後のRT-PCRの鋳型として用いた。RT-PCRはSequence Detection System Prism 7700 (PE Biosystems社) を使い、増幅と
- 20 検出のためのプライマーとして5' -CACCTGCAAGTACGAGAACGT-3' (配列番号: 16), 5' -TGCCCTTCCACAGTTCATC-3' (配列番号: 17) およびTaqMan probeとして5' - (Fam) -TGAGCCTGTGCTTCGAGAGCTTCA - (Tamra) -3' (配列番号: 18) を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (PE
- 25 Biosystems社) 12.5 μ lに、それぞれ100 μ Mのプライマー溶液を0.05 μ l、5 μ MのTaqMan probeを0.5 μ l、および上記で調製したcDNA溶液を0.5 μ l加え、蒸留水で総反応液量を25 μ lとした。PCR反応は50℃ 2分、95℃ 10分の後、95℃ 15秒、60℃ 1分のサイクルを40回繰り返した。得られたラット各種組織に

におけるGPR7リガンドのmRNA発現量はpoly (A) +RNA 1ngあたりのコピー数として算出した。ラット型TGR4 mRNAの発現は図15に示したように、免疫に関与する脾臓、リンパ節、腸管系組織で高発現していた。

- 5 実施例9 TGR4発現CHO細胞特異的なMAP kinaseの活性化
- ヒトTGR4発現CHO細胞ならびにmock細胞を 3×10^5 cells /wellで6-well plateに播種し、一晚培養した。無血清化のために0.1%BSAを添加した核酸不含 α -MEM培地と交換してさらに一晚培養し、アッセイの直前においても更に同培地で2時間のプレインキュベーションを実施した。0.1 μ Mのファルネシル2リン酸を培地に添加して処理を開始した後、一定時間ごとに培地を吸引除去、SDS-PAGE用のサンプルバッファーを添加して反応を停止させた。定法に従ってSDS-PAGEを実施し、ニトロセルロースフィルターに蛋白質を転写した後、Phospho Plus p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Antibody Kit (Cell Signaling社)のマニュアル記載の方法に従ってリン酸化型p44/42 MAP kinaseの検出を行った。その結果、ファルネシル2リン酸処理によってヒトTGR4発現CHO細胞に特異的にMAP kinaseのリン酸化が検出され、同酵素が活性化されたことが明らかになった。

- 20 実施例10 各種リン脂質化合物関連物質によるTGR4特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の濃度依存性

- 実施例7に記載の方法と同様に、TGR4発現CHO細胞およびmock CHO細胞を用いてリン脂質化合物関連物質による細胞内カルシウムイオン動員活性の濃度依存性について検討した。リン脂質化合物関連物質として、ガラニルガラニル2リン酸、ファルネシル2リン酸、ガラニル2リン酸、リゾフォスファチジン酸、スフィンゴシン1リン酸、ノルデオキシコール酸、デオキシコール酸、ガラニルガラニオール、ファルネソールを用いた。その結果、図16に示す通り、ガラニルガラニル2リン酸、ファルネシル2リン酸、リゾフォスファチジン酸などのリン脂質をCHO-TGR4に添加することにより濃度依

- 5 存的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。一方、図17に示すようにTGR4を発現していないmock CHO細胞では活性が認められなかった。このことから、上記のリン脂質化合物がTGR4特異的なアゴニストとして作用することが明らかになった。また、図に示した化合物以外のものも含めた関連化合物の、TGR4に対する細胞内カルシウムイオン動員活性のEC₅₀値は表1に示す通りであった。

〔表1〕

化合物名	EC ₅₀ 値 (μM)	
	細胞内Ca ²⁺ 動員活性*	cAMP産生上昇活性**
ジメチルアリル2リン酸	>2.5	>50
ガラニルガラニル2リン酸	0.019	3.5
ファルネシル2リン酸	0.029	3.1
ガラニル2リン酸	>2.5	>50
リゾホスファチジン酸	0.035	>50
スフィンゴシン1リン酸	1.5	>50
ガラニルガラニオール	>2.5	>50
ファルネソール	>2.5	>50
ガラニオール	>2.5	>50
ガラニルアミン	>2.5	>50
ガラニル酢酸	>2.5	>50
ガラニルアセトン	>2.5	>50
ガラニルクロライド	>2.5	>50
ノルデオキシコール酸	>2.5	>50
デオキシコール酸	>2.5	>50
リトコール酸	>2.5	>50

*：ファルネシル2リン酸 2×10^{-6} M添加時の反応を100%として算出。

- 10 **：ファルネシル2リン酸 1.15×10^{-6} M添加時の反応を100%として算出。

実施例11 各種リン脂質化合物関連物質によるTGR4特異的なcAMP産生上昇活性の濃度依存性

- 15 実施例8に記載の方法と同様にTGR4発現CHO細胞およびmock CHO細胞を用いて、各種リン脂質化合物関連物質によるcAMP産生上昇活性の濃度依存性について検討した。その結果、図18に示す通り、ガラニルガラニル2リン酸、ファルネシル2リン酸、リゾホスファチジン酸などのリン脂

- 質をCHO-TGR4に添加することにより濃度依存的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。化合物名の略称は実施例9を参照。一方、図19に示すようにTGR4を発現していないmock CHO細胞では活性が認められなかった。このことから、上記のリン脂質化合物がTGR4特異的なアゴニストとして作用することが明らかになった。また、図に示した化合物以外のものも含めた関連化合物の、TGR4に対するcAMP産生上昇活性のEC₅₀値は実施例10の表1に示す通りであった。

産業上の利用可能性

- 10 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とリガンドであるリン脂質化合物とを用いることによって、リン脂質化合物と本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

請求の範囲

1. (1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分
5 ペプチドまたはその塩および(2) リン脂質化合物を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とリン脂質化合物との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
2. G蛋白質共役型レセプター蛋白質が配列番号：1、配列番号：8または配列番号：10 で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質である請求項1 記
10 載のスクリーニング方法。
3. リン脂質化合物が(1) 1個以上のイソプレン単位からなる繰り返し構造の末端にピロリン酸基が結合した化合物、または(2) グリセロール骨格に1個のリン酸基が結合し、さらに1個の脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合した化合物である請求項1 記載のスクリーニング方法。
- 15 4. リン脂質化合物がガラニルガラニル2リン酸(GGPP)、ファルネシル2リン酸(FPP)またはリゾフォスファチジン酸(LPA)である請求項1 記載のスクリーニング方法。
5. リン脂質化合物がガラニルガラニル2リン酸(GGPP)またはファルネシル2リン酸(FPP)である請求項1 記載のスクリーニング方法。
- 20 6. (1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) リン脂質化合物を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とリン脂質化合物との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 25 7. 請求項1 記載のスクリーニング方法または請求項6 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リン脂質化合物と配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

8. リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

5 9. 中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤である請求項8記載の医薬。

10 10. 肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項8記載の医薬。

11. 試験化合物を配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における細胞内Ca²⁺濃度上昇活性または細胞内cAMP生成活性を測定することを特徴とする該Gタンパク質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

12. 請求項11記載の方法で得られるリガンド。

13. (i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩とを接触させた場合と、(ii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

14. (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる

- 標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を該
- 5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：
- 10 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
- 15 15. (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を、該G蛋白質共役型
- 20 レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト
- 25 のスクリーニング方法。
16. (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる

標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

17. (i) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) ①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、①標識したリン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

18. (i) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG

- 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、 (ii) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- 5 および試験化合物を該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、細胞内Ca²⁺濃度上昇活性または細胞内cAMP生成活性を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
- 10 19. (i) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、 (ii) ①リン脂質化合物または②リン脂質化合物と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、細胞内Ca²⁺濃度上昇活性または細胞内cAMP生成活性を測定し、比較することを特徴とする、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
- 15 20. リン脂質化合物が(1) 1個以上のイソプレン単位からなる繰り返し構造の末端にピロリン酸基が結合した化合物、または(2) グリセロール骨格に1個のリン酸基が結合し、さらに1個の脂肪酸または長鎖アルコールがエステル結合した化合物である請求項1記載のスクリーニング方法。
- 20 21. リン脂質化合物がガラニルガラニル2リン酸(GGPP)、ファルネシ

- ル2リン酸 (FPP) またはリゾフォスファチジン酸 (LPA) である請求項 13～20記載のスクリーニング方法。
22. リン脂質化合物がゲラニルゲラニル2リン酸 (GGPP) またはファルネシル2リン酸 (FPP) である請求項 13～20記載のスクリーニング方法。
- 5 23. 試験化合物が配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物である請求項 13～20記載のスクリーニング方法。
- 10 24. 請求項 13～23のいずれかに記載のスクリーニング方法を用いて得られる配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト。
- 15 25. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる医薬。
- 20 26. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤。
27. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。
- 25 28. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。

29. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。
30. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断剤。
31. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断方法。
32. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。
33. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。
34. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛み

または肥満の診断剤。

35. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の定
5 量方法を用いることを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の診断方法。

36. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペ
10 チドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤。

37. 哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一も
15 しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、③配列
20 番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体
25 または⑤配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療

方法。

38. 中枢性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、糖尿病、免疫系疾患、肝臓・胆のう疾患、消化器系疾患、不安、痛みまたは肥満の予防・治療剤を製造するための①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
- 5 のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体または⑤配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの使用。
- 10 39. 配列番号：8または配列番号：10で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩。
- 15 40. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
41. 配列番号：9または配列番号：11で表わされる塩基配列からなるDNA。
42. 請求項40記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 25 43. 請求項42記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
44. 請求項43記載の形質転換体を培養し、請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を生成せしめることを特徴とする請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
45. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチド

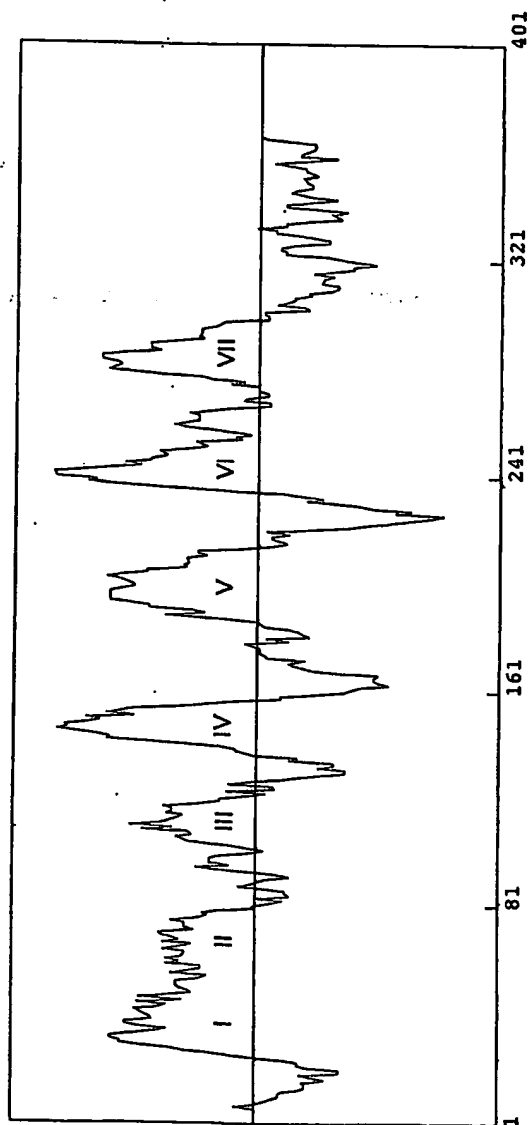
- またはその塩を含有してなる医薬。
46. 請求項40記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
47. 請求項40記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
48. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチド
- 5 またはその塩に対する抗体。
49. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項48記載の抗体。
50. 請求項48記載の抗体を含有してなる診断剤。
51. 請求項48記載の抗体を含有してなる医薬。
- 10 52. 請求項40記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
53. 請求項52記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
54. 請求項52記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 15 55. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
56. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用
- 20 キット。
57. 請求項55記載のスクリーニング方法または請求項56記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニスト。
- 25 58. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有してなる医薬。
59. 請求項40記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

60. 請求項40記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

5 61. 請求項59記載のスクリーニング方法または請求項60記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

62. 請求項39記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

⊗ 1

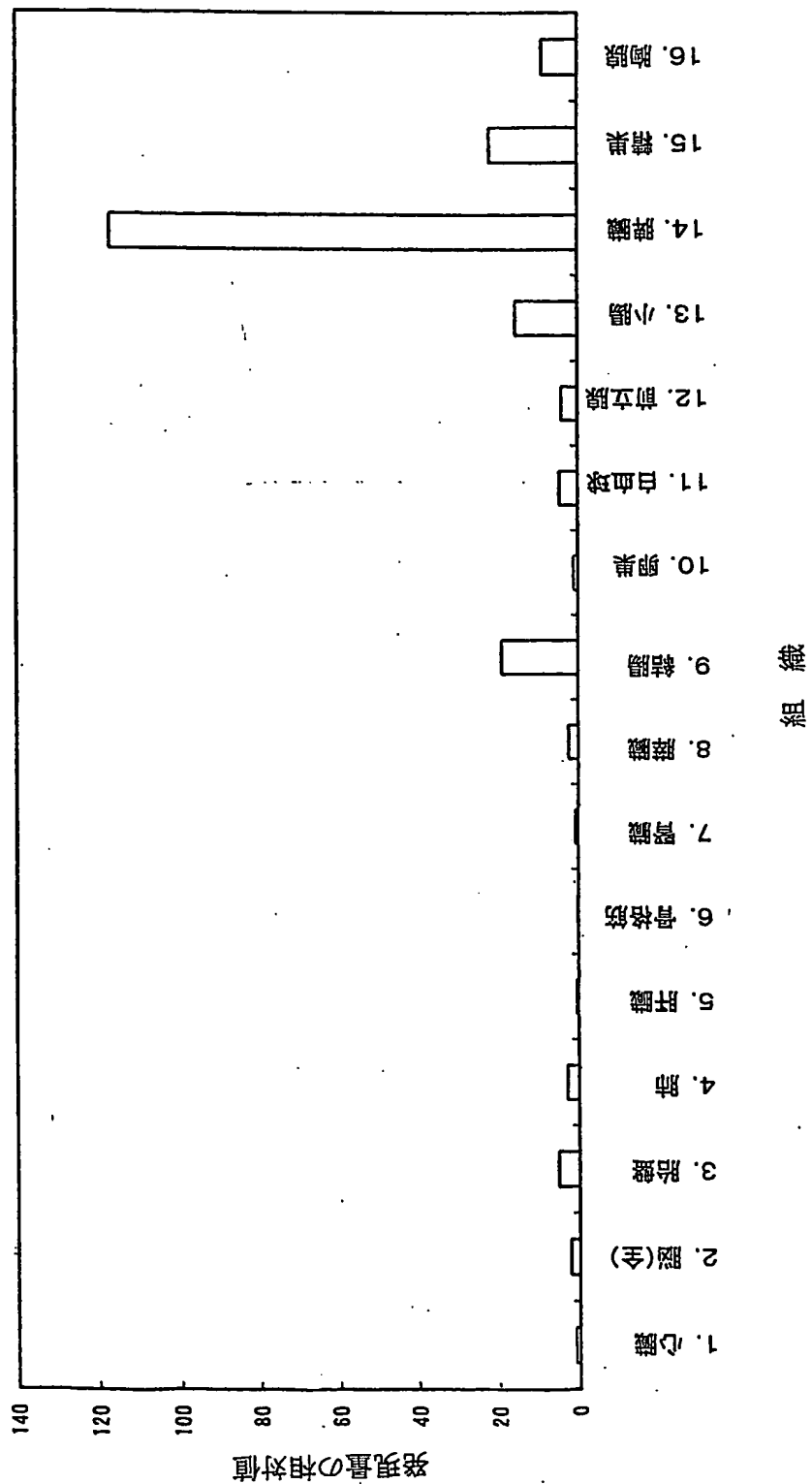


2/19

2

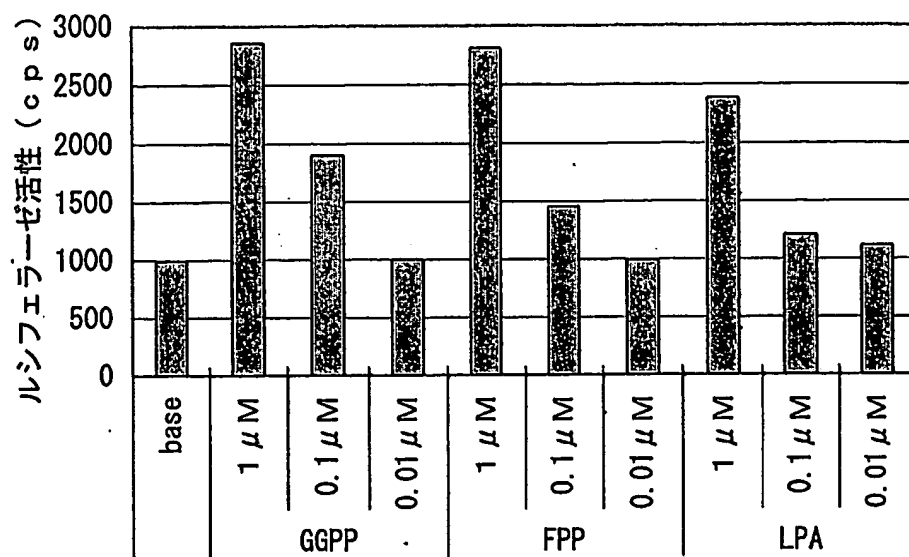
MLANSSSTNSSVLPCPDYRPTHRLHLVVYSLV
LAAGLPLNALALWVFLRALRVHSVVSVYMCNL
AASDLLFTLSLPVRLSYIALHHWPFPDLLCQT
TGAI FQMNMYGSCIFLMLINVDRYAAIVHPLR
LRHLRRPRVARLLCLGVWALILVFAVPAARVH
RPSRCRYRDLEVRLCFESFSDELWKGRLLPLV
LLAEALGFLLPLAAVVYSSGRVFWTLARPDAT
QSQR RRKTVRLLLANLVIFLLCFVPYNSTLAV
YGLLR SKLVAAASVPARDRVRGVLMVMVLLAGA
NCVLDPLVYYFSAEGFRNTLRGLGTPHRARTS
ATNGTRAALAQSERSAVTTDATRPDAASQGLL
RPSDSHSLSSFTQCPQDSAL

図 3



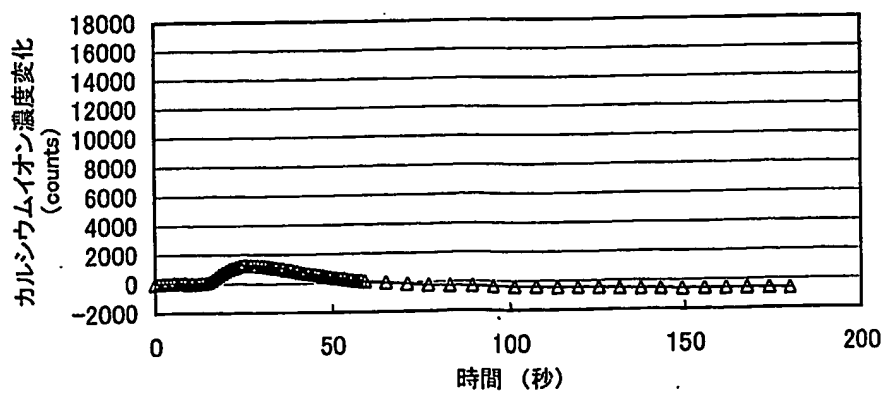
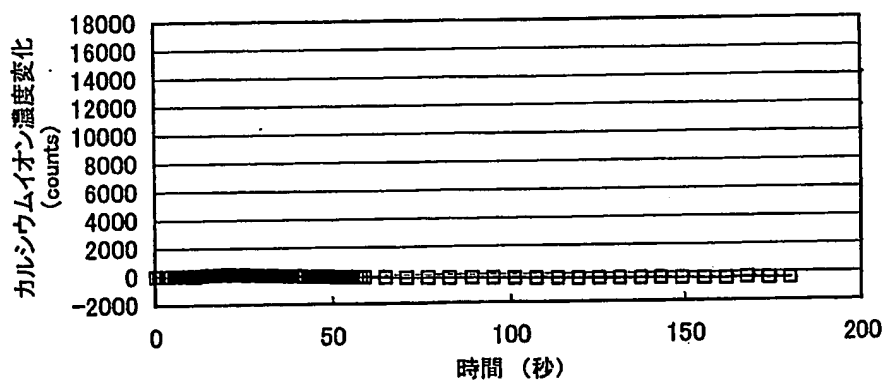
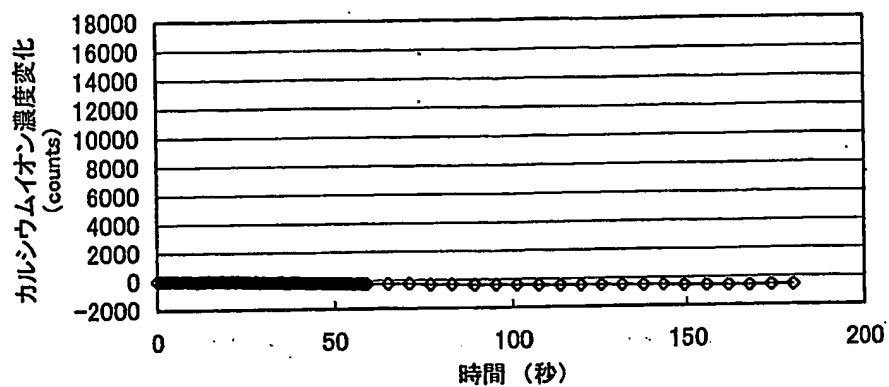
4/19

図 4



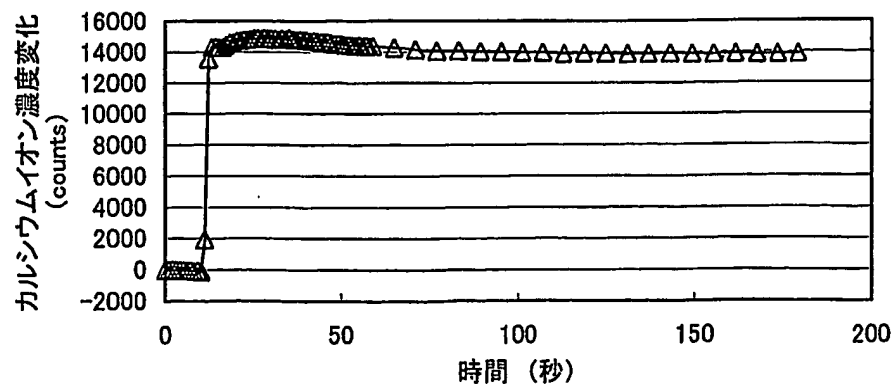
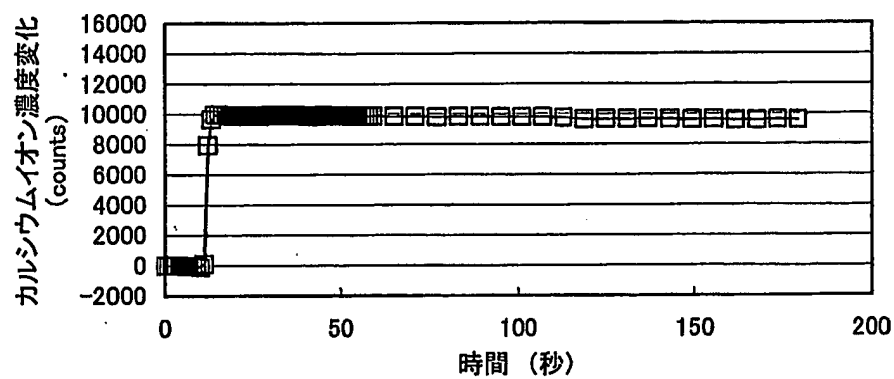
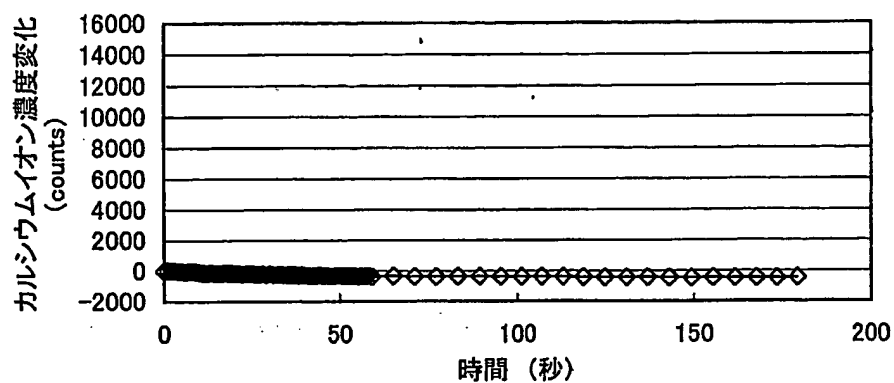
5/19

図 5



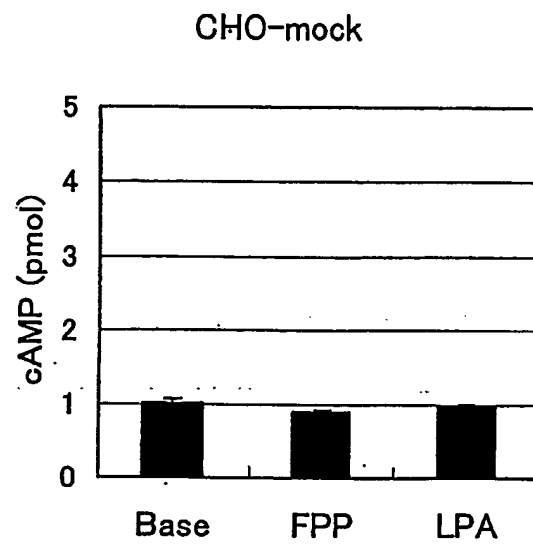
6/19

図 6



7/19

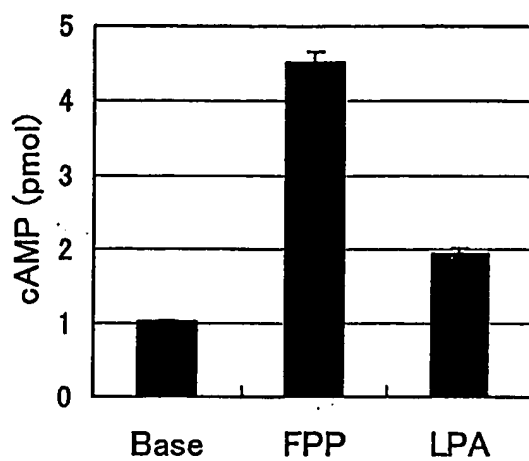
7



8/19

8

CHO-TGR4




9/19

 9

atgoctcaga ctagttttct tccccacctg gacgccatgt ttgccaattc ttcagccaac 60
 acctctttcta ccgacagctc tgtgccccag tgccgtgact atcggagtac acatcgtttg 120
 catatggtgg tctacagctt ggtgttggca accggtcttc ctctcaacgc tctggctctc 180
 tgggtcttcc tgccgtgact ggcgttacac tcggtgggtga gtgtgtacat gtgcaacctg 240
 gcagccagcg acttgccttt caccctgtca cttcccctgc gcctctccta ctatgcacgg 300
 caccactggc ccttcccaga cttcctgtgc cagacgtcgg gcgccatctt ccagatgaac 360
 atgtatggca gctgtatctt tctgatgctc atcaacgtgg accgctatgc ggccatcgtg 420
 catccgctga gactgcgcca tctgcggcgg cccctcgtgg cgcggcggct ctgcctgggc 480
 gtgtgggctc tcatctgtgt gttcgcctgt cccgccgccc gcgtgcacag cccgaccacc 540
 tgcaagtaag agaacgtcac cctgagcctg tgcttcgaga gcttcagcga tgaactgttg 600
 aagggcaggg tgctgccact cctgctgtgt gccgagaccc tgggctttct gctgccctg 660
 ggcgctgtcg tctattcgtc cggcagggct ttctggacac tggcgaggcc cgaagccact 720
 cagagccacc ggcgacagaa gaccgtgcgc ctcctactgg ccaacctcat catctttctg 780
 ctgtgcttcg tgccctacaa ctccacgtg gcagtttatg ggttgcctgc ggccaacctg 840
 gtaaagaaca gccttcaggg ccgcgatcag gtgcggggag tgctgatgat aatggtgtgt 900
 ctggccgggtg ccaactgcgt gctggatcgg ctggtttact acttcagcgc cgagggtttt 960
 cgtaacactc ttcgaaacct gggcgtccg ttccatacca ggcctttgcc taccaatggg 1020
 actagagggg agctcacgga accaccctca gaaagcacc aaaacactgg gcaggatgcc 1080
 accagccaga ggctacttca acctgccaat ctgggtacac gcaaggacaa cggcccccaa 1140
 gattcagccc tctga 1155

10/19

 1 O

Met Pro Gln Thr Ser Phe Ser Pro His Leu Asp Ala Met Phe Ala Asn
 5 10 15
 Ser Ser Ala Asn Thr Ser Ser Thr Asp Ser Ser Val Pro Gln Cys Arg
 20 25 30
 Asp Tyr Arg Ser Thr His Arg Leu His Met Val Val Tyr Ser Leu Val
 35 40 45
 Leu Ala Thr Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu
 50 55 60
 Arg Val Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu
 65 70 75 80
 Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Leu Arg Leu Ser
 85 90 95
 Tyr Tyr Ala Arg His His Trp Pro Phe Pro Asp Phe Leu Cys Gln Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Leu
 115 120 125
 Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg
 130 135 140
 Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Leu Val Ala Arg Arg Leu Cys Leu Gly
 145 150 155 160
 Val Trp Ala Leu Ile Leu Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His
 165 170 175
 Ser Pro Thr Thr Cys Lys Tyr Glu Asn Val Thr Leu Ser Leu Cys Phe
 180 185 190
 Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu
 195 200 205
 Leu Leu Ala Glu Thr Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val
 210 215 220
 Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Ser His Arg Arg Gln Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu
 245 250 255
 Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val
 260 265 270
 Tyr Gly Leu Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Ser Leu Gln Ala Arg
 275 280 285
 Asp Gln Val Arg Gly Val Leu Met Ile Met Val Leu Leu Ala Gly Ala
 290 295 300
 Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe
 305 310 315 320
 Arg Asn Thr Leu Arg Asn Leu Gly Ala Pro Phe His Thr Arg Pro Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Gly Thr Arg Gly Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Glu Ser
 340 345 350
 Thr Gln Asn Thr Gly Gln Asp Ala Thr Ser Gln Arg Leu Leu Gln Pro
 355 360 365
 Ala Asn Leu Gly Thr Arg Thr Asp Asn Gly Pro Gln Asp Ser Ala Leu
 370 375 380

11/19

 1 1

```

atgcctcaga ctaatttctc ttcccacctg gacatgatgt ttgccaattc ttcagccaac   60
acgacttcta ccaacagctc tgtgtccag tgccctgact atcgagatac acatcgtttg   120
catatgggtg totacagcct ggtattggcg actggctctc ctctcaacgc tctggctctc   180
tggttcttcc tgcgtgtact gcggtacac tcagtgggtga gogtgtacat gtgcaacctg   240
gcagccagcg acttgcctt caccctgtca ctcccctgc gcctctcta ctatgcacag   300
caccactggc cttttccagg ctctctgtgc cagacgtcgg gogccatctt ccagatgaac   360
atgtaaggca gctgtctctt totgatgctc atcaacgtgg acogctatgc ggccatcgtg   420
caccogctga gactgogcca cctacggcgg cccogtgtgg caogggcgt ctgcctgggc   480
gtgtgggctc tcatcctgct gtgcgtgtg cccgcggccc gogtgcacag ccgctccac   540
tgcaagtaca agaacatcac tgtgogcctg tgottcgaga gottcagcga tgaactgtgg   600
aagggcaggc tgctccgct cctgctgctg gccgagatac taggccttct gctgccctg   660
goggctgtcg tctattogtc tggcagagtc ttctggacac tggogaggcc cgacgccact   720
cagagccaac ggogacggaa gaccgtgcgc ctctgctgg ccaatctcat catcttcctg   780
ctgtgcttcg tgccctataa ctccacgctg gctgtatatg ggttgctacg ggccaacttg   840
gtgaagaaca gcattcagga ccgcgatcag gtgcgcgggg tgotgatgat aatggtgctg   900
ctggccggcg ccaactgcgt gctggatcca ctggtttact acttcagtgc cgagggttct   960
cgtaacacco ttgcacact gggcgccccg ctgaatacca ggcttttggc taccaatggg  1020
gctgcaggcg tgctcaccga actacctca gaaagcacc aaacactgg gcaggatgcc  1080
acaagtcagg ttctactcca gcctgccact ctgggtacac ccccgacaa ctgctcccag  1140
gattoggctc tctga                                     1155

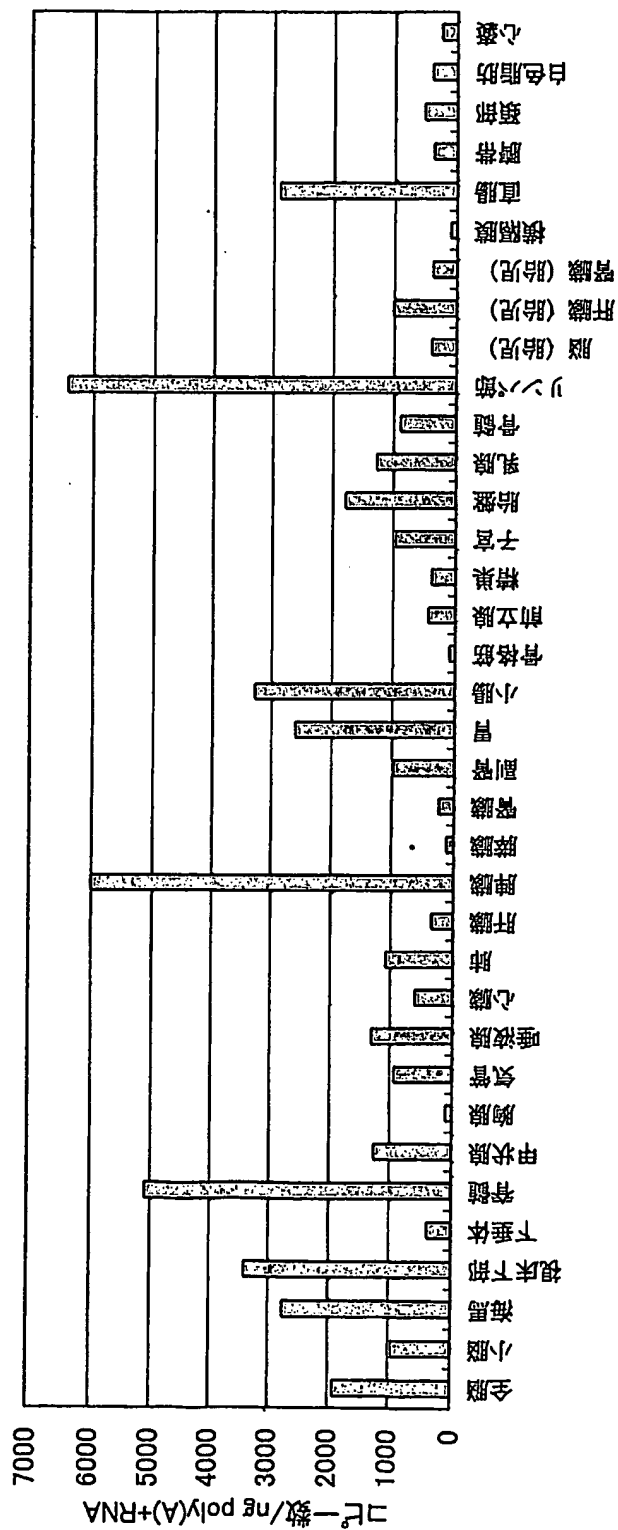
```

12/19

1 2

Met Pro Gln Thr Asn Phe Ser Ser His Leu Asp Met Met Phe Ala Asn
 5 10 15
 Ser Ser Ala Asn Thr Thr Ser Thr Asn Ser Ser Val Leu Gln Cys Pro
 20 25 30
 Asp Tyr Arg Asp Thr His Arg Leu His Met Val Val Tyr Ser Leu Val
 35 40 45
 Leu Ala Thr Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu
 50 55 60
 Arg Val Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu
 65 70 75 80
 Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Leu Arg Leu Ser
 85 90 95
 Tyr Tyr Ala Gln His His Trp Pro Phe Pro Gly Phe Leu Cys Gln Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Leu Phe Leu
 115 120 125
 Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg
 130 135 140
 Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Arg Val Ala Arg Arg Leu Cys Leu Gly
 145 150 155 160
 Val Trp Ala Leu Ile Leu Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His
 165 170 175
 Ser Pro Ser His Cys Thr Tyr Lys Asn Ile Thr Val Arg Leu Cys Phe
 180 185 190
 Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu
 195 200 205
 Leu Leu Ala Glu Ile Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val
 210 215 220
 Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Ser Gln Arg Arg Arg Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu
 245 250 255
 Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val
 260 265 270
 Tyr Gly Leu Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Ser Ile Gln Asp Arg
 275 280 285
 Asp Gln Val Arg Gly Val Leu Met Ile Met Val Leu Leu Ala Gly Ala
 290 295 300
 Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe
 305 310 315 320
 Arg Asn Thr Leu Arg Asn Leu Gly Ala Pro Leu Asn Thr Arg Pro Leu
 325 330 335
 Ala Thr Asn Gly Ala Ala Gly Val Leu Thr Glu Leu Pro Ser Glu Ser
 340 345 350
 Thr Gln Asn Thr Gly Gln Asp Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Gln Pro
 355 360 365
 Ala Thr Leu Gly Thr Pro Pro Asp Asn Cys Ser Gln Asp Ser Ala Leu
 370 375 380

図 1 3



14/19

図 1 4

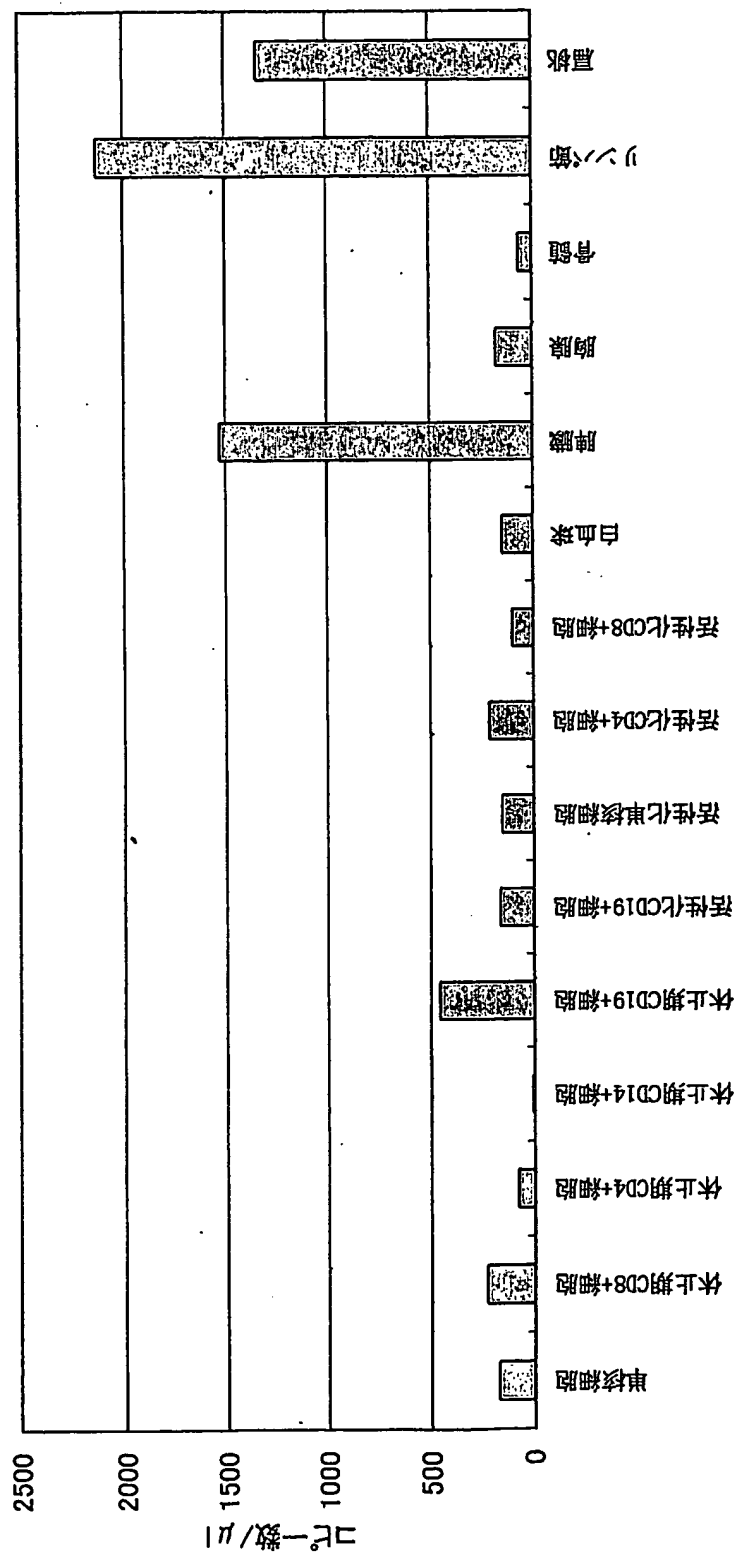
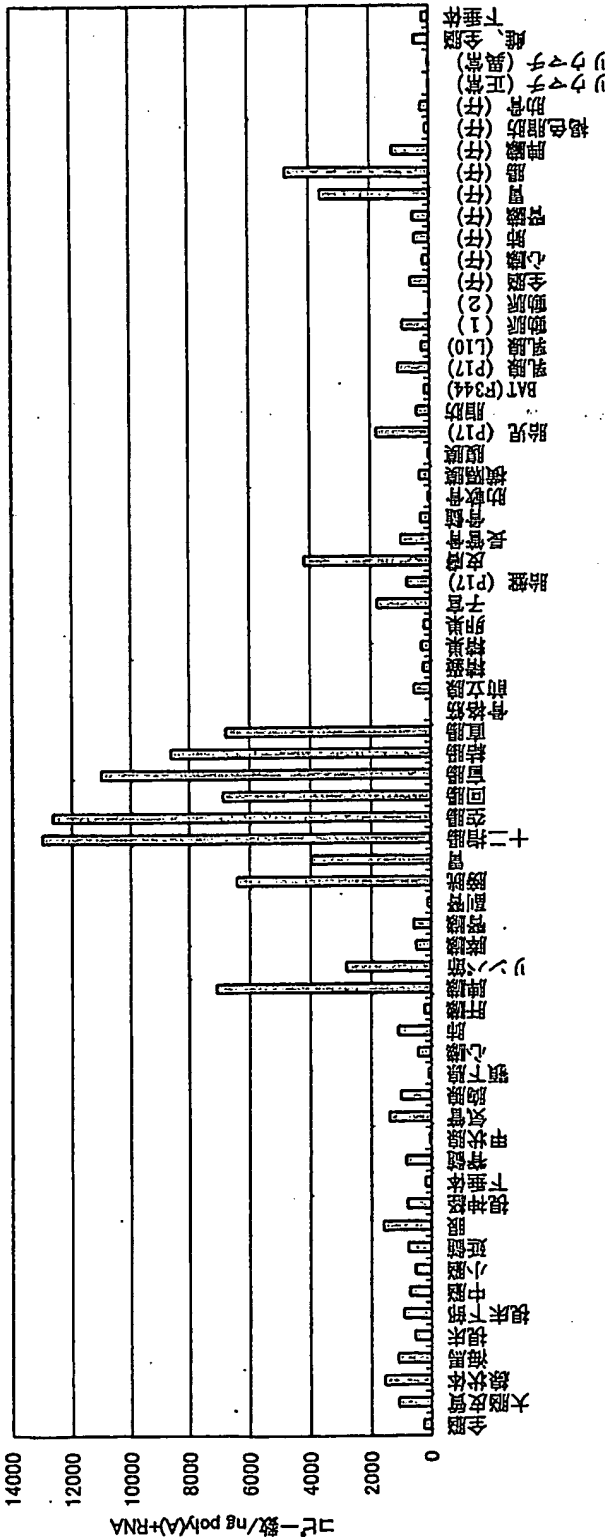


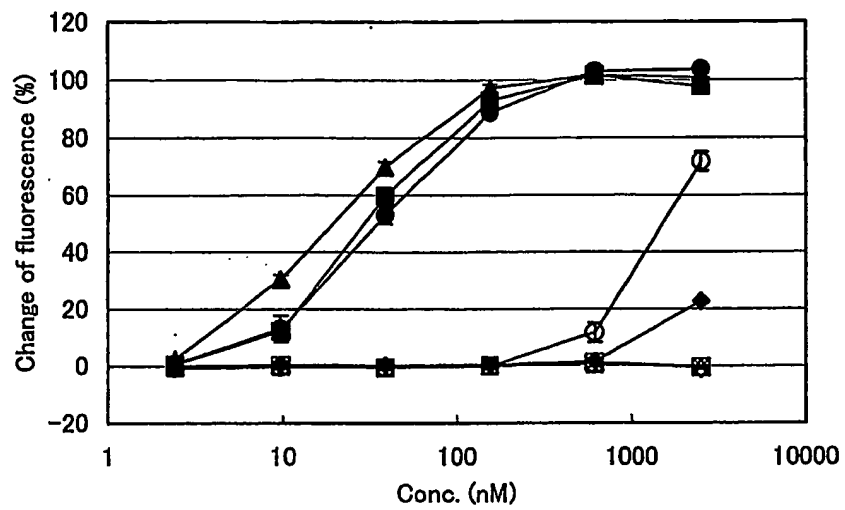
図 15



16/19

16

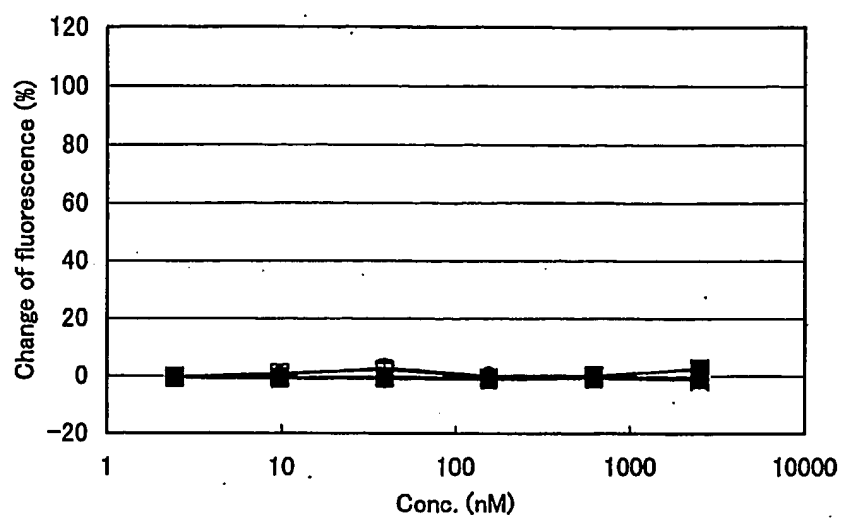
TGR4



17/19

17

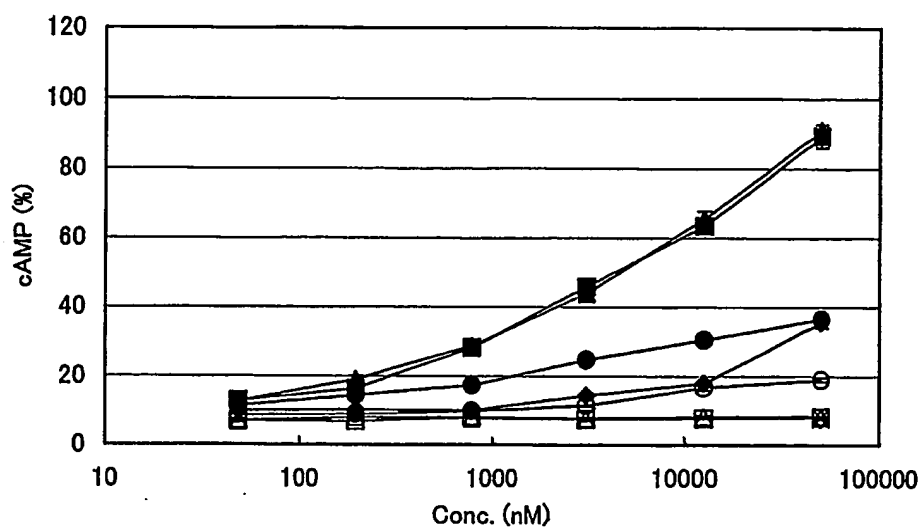
mock



18/19

18

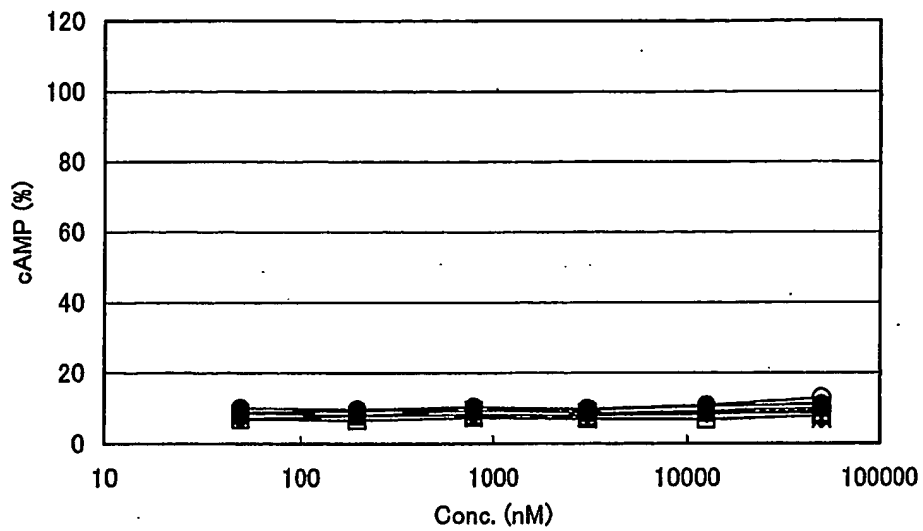
TGR4



19/19

⊗ 1 9

mock



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Screening Method

<130> 2946W00P

<150> JP 2001-258479

<151> 2001-08-28

<160> 18

<210> 1

<211> 372

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Leu Ala Asn Ser Ser Ser Thr Asn Ser Ser Val Leu Pro Cys Pro

5

10

15

Asp Tyr Arg Pro Thr His Arg Leu His Leu Val Val Tyr Ser Leu Val

20

25

30

Leu Ala Ala Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu

35

40

45

Arg Ala Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu

50

55

60

Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Ser

65

70

75

80

Tyr Tyr Ala Leu His His Trp Pro Phe Pro Asp Leu Leu Cys Gln Thr

85

90

95

Thr Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Leu

100

105

110

Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg

115

120

125

Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Arg Val Ala Arg Leu Leu Cys Leu Gly

2/12

130	135	140	
Val Trp Ala Leu Ile Leu Val Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His			
145	150	155	160
Arg Pro Ser Arg Cys Arg Tyr Arg Asp Leu Glu Val Arg Leu Cys Phe			
	165	170	175
Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Val			
	180	185	190
Leu Leu Ala Glu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val			
	195	200	205
Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr			
	210	215	220
Gln Ser Gln Arg Arg Arg Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu			
225	230	235	240
Val Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val			
	245	250	255
Tyr Gly Leu Leu Arg Ser Lys Leu Val Ala Ala Ser Val Pro Ala Arg			
	260	265	270
Asp Arg Val Arg Gly Val Leu Met Val Met Val Leu Leu Ala Gly Ala			
	275	280	285
Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe			
	290	295	300
Arg Asn Thr Leu Arg Gly Leu Gly Thr Pro His Arg Ala Arg Thr Ser			
305	310	315	320
Ala Thr Asn Gly Thr Arg Ala Ala Leu Ala Gln Ser Glu Arg Ser Ala			
	325	330	335
Val Thr Thr Asp Ala Thr Arg Pro Asp Ala Ala Ser Gln Gly Leu Leu			
	340	345	350
Arg Pro Ser Asp Ser His Ser Leu Ser Ser Phe Thr Gln Cys Pro Gln			
	355	360	365

3/12

Asp Ser Ala Leu

370

<210> 2

<211> 1116

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```
atgttagcca acagctcctc aaccaacagt tctgttctcc cgtgtcctga ctaccgacct 60
acccaccgcc tgcacttggt ggtctacagc ttggtgctgg ctgccgggct cccctcaac 120
gcgctagccc tctgggtctt cctgcgcgcg ctgcgcgtgc actcggtggt gagcgtgtac 180
atgtgtaacc tggcggccag cgacctgctc ttcacctctc cgctgcccggt tcgtctctcc 240
tactacgcac tgcaccactg gcccttcccc gacctcctgt gccagacgac gggcgccatc 300
ttccagatga acatgtacgg cagctgcac ttcctgatgc tcatcaacgt ggaccgctac 360
gccgccatcg tgcacccgct gcgactgcgc cacctgcggc ggccccgcgt ggcgcggtg 420
ctctgcctgg gcgtgtgggc gctcatcctg gtgtttgccg tgccccgcgc ccgctgcac 480
aggccctcgc gttgccgcta ccgggacctc gaggtgcgcc tatgcttoga gagcttcagc 540
gacgagctgt ggaaaggcag gctgctgccc ctctgtctgc tggccgaggc gctgggcttc 600
ctgctgcccc tggcggcggt ggtctactcg tcgggcccag tcttctggac gctggcgcgc 660
cccagaccca cgagagacca gcggcggcgg aagaccgtgc gcctcctgct ggctaacctc 720
gtcatcttcc tgctgtgctt cgtgccctac aacagcacgc tggcgggtcta cgggctgctg 780
cggagcaagc tgggtggcggc cagcgtgcct gcccgcgatc gcgtgcgcgg ggtgctgatg 840
gtgatgggtg tgctggccgg cgccaactgc gtgctggacc cgctggtgta ctactttagc 900
gccgagggct tccgaacac cctgcgcggc ctgggcactc cgcaccgggc caggacctcg 960
gccaccaacg ggacgcgggc ggcgctcgcg caatccgaaa ggtccgccgt caccaccgac 1020
gccaccaggc cggatgccgc cagtcagggg ctgctccgac cctccgactc ccactctctg 1080
tcttccttca cacagtgtcc ccaggattcc gccctc 1116
```

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

gggtcgacat gttagccaac agtcctcaa ccaac 35

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

ggactagttc agaggcgga atcctgggga cac 33

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 5

ttcgtctctc ctactacga ctgcacca 28

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

ggtggtgagc gtgtacatgt gt 22

5/12

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

catgttcacg tggaagatgg cg 22

<210> 8

<211> 384

<212> PRT

<213> Rat

<400> 8

Met Pro Gln Thr Ser Phe Ser Pro His Leu Asp Ala Met Phe Ala Asn

5

10

15

Ser Ser Ala Asn Thr Ser Ser Thr Asp Ser Ser Val Pro Gln Cys Arg

20

25

30

Asp Tyr Arg Ser Thr His Arg Leu His Met Val Val Tyr Ser Leu Val

35

40

45

Leu Ala Thr Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu

50

55

60

Arg Val Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu

65

70

75

80

Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Leu Arg Leu Ser

85

90

95

Tyr Tyr Ala Arg His His Trp Pro Phe Pro Asp Phe Leu Cys Gln Thr

100

105

110

Ser Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Leu

115

120

125

6/12

Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg
 130 135 140
 Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Leu Val Ala Arg Arg Leu Cys Leu Gly
 145 150 155 160
 Val Trp Ala Leu Ile Leu Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His
 165 170 175
 Ser Pro Thr Thr Cys Lys Tyr Glu Asn Val Thr Leu Ser Leu Cys Phe
 180 185 190
 Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu
 195 200 205
 Leu Leu Ala Glu Thr Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val
 210 215 220
 Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr
 225 230 235 240
 Gln Ser His Arg Arg Gln Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu
 245 250 255
 Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val
 260 265 270
 Tyr Gly Leu Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Ser Leu Gln Ala Arg
 275 280 285
 Asp Gln Val Arg Gly Val Leu Met Ile Met Val Leu Leu Ala Gly Ala
 290 295 300
 Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe
 305 310 315 320
 Arg Asn Thr Leu Arg Asn Leu Gly Ala Pro Phe His Thr Arg Pro Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Gly Thr Arg Gly Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Glu Ser
 340 345 350
 Thr Gln Asn Thr Gly Gln Asp Ala Thr Ser Gln Arg Leu Leu Gln Pro

7/12

355 360 365
 Ala Asn Leu Gly Thr Arg Thr Asp Asn Gly Pro Gln Asp Ser Ala Leu
 370 375 380
 <210> 9
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 9
 atgcctcaga ctagtttctc tccccacctg gacgccatgt ttgccaattc ttcagccaac 60
 acctcttcta ccgacagctc tgtgccccag tgccgtgact atcggagtac acatcgtttg 120
 catatgggtg tctacagctt ggtgttgga accggtcttc ctctcaacgc tctggctctc 180
 tgggtcttcc tgcgtgtact gcgcgtacac tcgggtggtga gtgtgtacat gtgcaacctg 240
 gcagccagcg acttgctctt caccctgtca ctccccctgc gcctctccta ctatgcacgg 300
 caccactggc ccttcccaga ctctctgtgc cagacgtcgg gcgccatctt ccagatgaac 360
 atgtatggca gctgtatctt tctgatgtc atcaacgtgg accgctatgc ggccatcgtg 420
 catccgctga gactgcgcca tctgcggcgg cccctcgtgg cgcggcggct ctgcctgggc 480
 gtgtgggctc tcactctgct gttcgccgtg cccgccgccc gcgtgcacag cccgaccacc 540
 tgcaagtacg agaacgtcac cctgagcctg tgcttcgaga gcttcagcga tgaactgtgg 600
 aagggcagcg tgctgccact cctgctgctg gccgagaccc tgggctttct gctgcccctg 660
 gcggctgtcg tctattcgtc cggcagggtc ttctggacac tggcgaggcc cgacgccact 720
 cagagccacc ggcgacagaa gaccgtgcgc ctctactgg ccaacctcat catctttctg 780
 ctgtgcttcg tgccctacaa ctccacgtg gcagtttatg ggttgctgcg ggccaacctg 840
 gtaaagaaca gccttcaggc ccgcgatcag gtgcgcggag tgctgatgat aatggtgctg 900
 ctggccggtg ccaactgcgt gctggatccg ctggtttact acttcagcgc cgagggtttt 960
 cgtaacactc ttcgaaacct gggcgctccg ttctatacca ggcctttgcc taccaatggg 1020
 actagagggg agctcaccga accaccctca gaaagcacc aaaacactgg gcaggatgcc 1080
 accagccaga ggctacttca acctgccaat ctgggtacac gcacggacaa cggcccccaa 1140
 gattcagccc tc 1152
 <210> 10

8/12

<211> 384

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 10

Met Pro Gln Thr Asn Phe Ser Ser His Leu Asp Met Met Phe Ala Asn
 5 10 15
 Ser Ser Ala Asn Thr Thr Ser Thr Asn Ser Ser Val Leu Gln Cys Pro
 20 25 30
 Asp Tyr Arg Asp Thr His Arg Leu His Met Val Val Tyr Ser Leu Val
 35 40 45
 Leu Ala Thr Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu
 50 55 60
 Arg Val Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu
 65 70 75 80
 Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Leu Arg Leu Ser
 85 90 95
 Tyr Tyr Ala Gln His His Trp Pro Phe Pro Gly Phe Leu Cys Gln Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Leu Phe Leu
 115 120 125
 Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg
 130 135 140
 Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Arg Val Ala Arg Arg Leu Cys Leu Gly
 145 150 155 160
 Val Trp Ala Leu Ile Leu Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His
 165 170 175
 Ser Pro Ser His Cys Thr Tyr Lys Asn Ile Thr Val Arg Leu Cys Phe
 180 185 190
 Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu

9/12

195	200	205
Leu Leu Ala Glu Ile Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val		
210	215	220
Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr		
225	230	235
Gln Ser Gln Arg Arg Arg Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu		
245	250	255
Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val		
260	265	270
Tyr Gly Leu Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Ser Ile Gln Asp Arg		
275	280	285
Asp Gln Val Arg Gly Val Leu Met Ile Met Val Leu Leu Ala Gly Ala		
290	295	300
Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe		
305	310	315
Arg Asn Thr Leu Arg Asn Leu Gly Ala Pro Leu Asn Thr Arg Pro Leu		
325	330	335
Ala Thr Asn Gly Ala Ala Gly Val Leu Thr Glu Leu Pro Ser Glu Ser		
340	345	350
Thr Gln Asn Thr Gly Gln Asp Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Gln Pro		
355	360	365
Ala Thr Leu Gly Thr Pro Pro Asp Asn Cys Ser Gln Asp Ser Ala Leu		
370	375	380

<210> 11

<211> 1152

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 11

atgcctcaga ctaatttctc ttcccacctg gacatgatgt ttgccaattc ttcagccaac 60

10/12

```

acgacttcta ccaacagctc tgtgctccag tgccctgact atcgagatac acatcgtttg 120
catatgggtgg tctacagcct ggtattggcg actggtctcc ctctcaacgc tctggctctc 180
tgggtcttcc tgcgtgtact gcgcgtacac tcagtgggga gcgtgtacat gtgcaacctg 240
gcagccagcg acttgctctt caccctgtca cttcccctgc gcctctccta ctatgcacag 300
caccactggc cttttccagg cttcctgtgc cagacgtcgg gcgccatctt ccagatgaac 360
atgtacggca gctgtctctt tctgatgctc atcaacgtgg accgctatgc ggccatcgtg 420
caccgcgtga gactgcgcca cctacggcgg ccccggtgtg cacggcgggt ctgcctgggc 480
gtgtgggctc tcacctgtgt gttcgtgtg cccgccgccc gcgtgcacag cccgtcccac 540
tgcacgtaca agaacatcac tgtgcgcctg tgcttcgaga gttcagoga tgaactgtgg 600
aagggcaggc tgctgcgct cctgtgtgtg gccagatac taggctttct gctgcccctg 660
gcggctgtcg tctattcgtc tggcagagtc ttctggacac tggcgaggcc cgacgccact 720
cagagccaac ggcgacggaa gaccgtgcgc ctctgtgtgg ccaatctcat catcttcctg 780
ctgtgcttcg tgccctataa ctccacgtg gctgtatatg ggttgctacg ggccaacttg 840
gtgaagaaca gcattcagga ccgcgatcag gtgcgcgggg tgctgatgat aatggtgctg 900
ctggccggcg ccaactgcgt gctggatcca ctggtttact acttcagtgc cgagggtttc 960
cgtaacaccc ttgcgaacct gggcgccccg ctgaatacca ggcctttggc taccaatggg 1020
gctgcaggcg tgctcaccga actaccctca gaaagcacc aaaacactgg gcaggatgcc 1080
acaagtcagg ttctactcca gcctgccact ctgggtacac ccccggacaa ctgctcccag 1140
gattcggtc tc 1152

```

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

gtcgacatgc ctcagactag tttctctccc cac 33

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

gctagccttt cagagggtg aatcttgggg gcc 33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

gtcgacatgc ctcagactaa tttctcttcc cac 33

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

gctagctcag agagcagaat cctgggagca gtt 33

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

12/12

cacctgcaag tacgagaacg t 21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

tgcccttcca cagttcatc 19

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 18

tgagcctgtg cttcgagagc ttca 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K38/16, A61K39/395, A61P1/00, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/10, A61P9/00, A61P25/00, A61P25/22, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K38/16, A61K39/395, A61P1/00, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/10, A61P9/00, A61P25/00, A61P25/22, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/50458 A (SmithKline Beecham Corp.), 31 August, 2000 (31.08.00), & EP 1157038 A	11, 12, 25-30, 32-34, 36, 38-62
Y		1-10, 13-24
Y	JP 2000-152792 A (Japan Tobacco Inc.), 06 June, 2000 (06.06.00), & WO 99/67383 A & AU 9941694 A	1-10, 13-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October, 2002 (24.10.02)		Date of mailing of the international search report 12 November, 2002 (12.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08622

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 31, 35, 37

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 31, 35 and 37 are mentioned as relating to "diagnostic methods" or "therapeutic methods" and it cannot be recognized that humans are excluded from the scope of the subjects. Thus, it is considered that the inventions (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08622

Continuation of Box No. I-1 of continuation of first sheet(1)

according to the above claims involve methods for treatment of the human body by surgery, therapy or diagnosis and, therefore, have no industrial applicability.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/08622

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))						
Int. Cl.	G01N 33/50	G01N 33/15	A61K 45/00	A61K 38/16	A61K 39/395	A61P 1/00
	A61P 1/16	A61P 3/04	A61P 3/10	A61P 9/00	A61P 25/00	A61P 25/22
	A61P 29/00	A61P 35/00	A61P 37/00			
B. 調査を行った分野						
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))						
Int. Cl.	G01N 33/50	G01N 33/15	A61K 45/00	A61K 38/16	A61K 39/395	A61P 1/00
	A61P 1/16	A61P 3/04	A61P 3/10	A61P 9/00	A61P 25/00	A61P 25/22
	A61P 29/00	A61P 35/00	A61P 37/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの						
日本国実用新案公報		1922-1996年				
日本国公開実用新案公報		1971-2002年				
日本国登録実用新案公報		1994-2002年				
日本国実用新案登録公報		1996-2002年				
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)						
C. 関連すると認められる文献						
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示					関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/50458 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2000. 08. 31 & EP 1157038 A					11, 12, 25-30, 32-34, 36, 38-62
Y						1-10, 13-24
Y	JP 2000-152792 A (日本たばこ産業株式会社) 2000. 06. 06 & WO 99/67383 A & AU 9941694 A					1-10, 13-24
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。						
* 引用文献のカテゴリー			の日の後に公表された文献			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの			「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの			
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの			「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの			
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)			「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの			
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献			「&」 同一パテントファミリー文献			
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願						
国際調査を完了した日			国際調査報告の発送日			
24. 10. 02			12.11.02			
国際調査機関の名称及びあて先			特許庁審査官 (権限のある職員)			
日本国特許庁 (ISA/J P)			宮澤 浩			
郵便番号 100-8915			2 J 9407			
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号			電話番号 03-3581-1101 内線 3250			

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 31, 35, 37 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲31, 35, 37に係る発明は、「診断方法」または「治療方法」と記載されており、また人を対象から除くものとも認められないことから、上記請求の範囲に係る発明は、人間を手術、治療、又は診断する方法を含むものと認められ、産業上の利用性が認められない。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。